

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**  
**ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**  
ННЦ «Інститут біології та медицини»  
Кафедра вірусології

Завідувач кафедри д.б.н, професор  
Будзанівська І. Г. Протокол №\_\_засідання  
кафедри від «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

**РОЗРОБКА МЕТОДУ ДЛЯ ОЦІНКИ СПЕЦИФІЧНОСТІ ВИЯВЛЕННЯ**  
**АНТИГЕН-СПЕЦИФІЧНИХ Т-КЛІТИН ЗА ДОПОМОГОЮ**  
**ПЕПТИДНИХ МНС-МУЛЬТИМЕРІВ**

Кваліфікаційна робота магістра  
денної форми навчання  
за спеціальністю 091 «Біологія»  
Горачко Лілії Євгеніївни

Науковий керівник від кафедри  
к.б.н., доц. Коротєєва Г. В.

Робота виконана на базі відділу імунології Цюріхського університету  
лабораторії проф. Онура Боймана під керівництвом Лаури Цегларек

Оцінка захисту роботи

---

**Київ – 2023 р.**

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

APC	–	Antigen presenting cells (антиген-презентуючі клітини)
AST	–	Antigen specific cells (антиген-специфічні клітини)
CCR7	–	C-C chemokine receptor type 7 (С-Схемокіновий рецептор 7)
CTL	–	Cytotoxic T-lymphocytes (цитотоксичні Т-лімфоцити)
DC	–	Dendric cells (дендритні клітини)
HLA	–	Human leukocyte antigen (людський лейкоцитарний антиген)
IFN- $\gamma$	–	Interferon gamma (інтерферон- $\gamma$ )
IL	–	Interleukin (інтерлейкін)
MHC	–	Major histocompatibility complex (головний комплекс гістосумісності)
NK	–	Natural killer (природні кілери)
PKI	–	Protein kinase inhibitor (інгібітор протеїнкінази)
TCR	–	T-cell receptor (Т-клітинний рецептор)
Treg	–	Regulatory T-cells (регуляторні Т-клітини)
T <sub>RM</sub>	–	Tissue-resident memory T-cells (тканинні Т-клітини пам'яті)
T <sub>EM</sub>	–	Effector memory T-cells (ефекторні Т-клітини пам'яті)
T <sub>CM</sub>	–	Central memory T-cells (центральні Т-клітини пам'яті)
Th	–	T-helper cells (Т-хелпери)

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	5
<b>РОЗДІЛ 1.</b> Характерні особливості формування вірусоспецифічної імунної відповіді .....	7
1.1. Формування вродженого та набутого імунітету .....	7
1.2. Класифікація Т-клітин та механізм розвитку імунної пам'яті .....	10
1.3. Шляхи активації Т-клітин .....	14
1.3.1. Стороння «Bystander» Т-клітинна активація .....	17
1.4. Імунна відповідь на вірусні інфекції .....	20
1.4.1. Формування набутої вірусоспецифічної імунної відповіді .....	23
1.5. Загальна характеристика МНС-мультимерів .....	25
<b>РОЗДІЛ 2.</b> Матеріали та методи досліджень .....	27
2.1. Донори зразків .....	27
2.1.1. Виділення РВМС .....	29
2.1.2. Фарбування МНС-мультимером .....	31
2.2. Методи дослідження .....	31
2.2.1. НЛА-типування .....	31
2.2.2. Ізоляція ДНК .....	34
2.2.3. Проточно-цитофлуориметричний аналіз .....	36
2.2.4. Сортування популяцій клітин .....	38
2.2.5. Статистичні методи аналізу .....	39
<b>РОЗДІЛ 3.</b> Результати досліджень та їхнє обговорення .....	40
3.1. Аналіз популяцій антиген-специфічних CD8 Т-клітин та їх активація ...	40
3.2. Вплив присутності комплексу з CD4 Т-клітин та APC на антиген-специфічні CD8 Т-клітини .....	43

3.3. Вплив інгібітора протеїнкінази на фарбування МНС-мультимером .....	46
3.4. Оптимізація методу виявлення антиген-специфічних CD8 Т-клітин за допомогою методу пептидної рестимуляції .....	49
<b>ВИСНОВКИ</b> .....	53
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b> .....	54

## ВСТУП

Фарбування за технологією, що містить МНС-декстрамери – це метод, який використовується для виявлення антиген-специфічних Т-лімфоцитів у зразку. Молекули головного комплексу гістосумісності (МНС) на поверхні антигенпрезентуючих клітин (APC) представляють пептидні фрагменти антигенів Т-клітинам, які розпізнають і зв'язуються з ними за допомогою своїх Т-клітинних рецепторів (TCR). МНС-декстрамери - це флуоресцентно мічені молекули, які імітують МНС-пептидні комплекси і можуть специфічно зв'язуватися з Т-клітинами з відповідними TCR. Фарбування зразка МНС-декстрамерами дозволяє ідентифікувати антиген-специфічні Т-лімфоцити за допомогою проточної цитофлуориметрії та провести їх кількісну оцінку. Цей метод використовується в наукових дослідженнях і клінічних застосуваннях для вивчення імунних реакцій на патогени, рак та інші захворювання.

Оптимізація протоколу фарбування МНС-декстрамером і забезпечення антиген-специфічної активації Т-клітин має вирішальне значення для майбутніх панелей з низкою різних пептидів і епітопів з кількох причин. По-перше, активація Т-клітин за допомогою фарбування МНС-декстрамерами є важливим етапом в аналізі імунної відповіді на специфічні патогени, такі як SARS-CoV-2, вірус, є відвідальним за пандемію COVID-19. Використовуючи МНС-декстрамери, навантажені відповідними вірусними пептидами, ми можемо специфічно ідентифікувати та ізолювати Т-клітини, які реагують на вірус. Крім того, застосовуючи оптимізований протокол, можна гарантувати специфічність виділених Т-клітин до антигену, при цьому не відбувається обрахування Т-клітин, які неспецифічно зв'язуються з МНС-декстрамером.

Після активації та виділення Т-лімфоцитів з їх можна далі аналізувати за допомогою секвенування РНК (scRNA-seq), щоб відстежити їх фенотиповий та клональний розвиток під час гострого перебігу COVID-19. Цей метод

дозволяє вивчати експресію генів окремих клітин, що може дати уявлення про їх функціональний статус, стан диференціювання та антигенну специфічність.

Оптимізуючи протокол, можна гарантувати, що виділені Т-лімфоцити точно відображають імунну відповідь на вірус і не будуть спотворені неспецифічним зв'язуванням або недостатньою активацією. Це, в свою чергу, підвищить якість і надійність даних scRNA-seq, надаючи більш детальне розуміння імунної відповіді на COVID-19 і потенційних мішеней для імунотерапії або розробки вакцин.

Метою роботи було розробити надійний підхід для виявлення антиген-специфічних CD8 Т-клітин за допомогою методу пептидної рестимуляції.

Для вирішення поставленої мети були сформульовані наступні завдання:

1. Виявити найефективніші умови стимуляції антиген-специфічних Т-клітин, що найкраще підходять для створення стандартизованого методу та оцінки ефективності використання різних епітопів.
2. Дослідити здатність протеїнкіназного інгібітора чинити вплив на кількісний та функціональний стан досліджуваних CD8 Т-клітин.
3. Визначити оптимальну тривалість інкубації для активації антиген-специфічних Т-клітин (18 - 48 год).
4. Встановити оптимальну концентрацію пептиду, необхідну для рестимуляції через рМНС-навантаження та подальшої активації CD8<sup>+</sup> Т-клітин периферичної крові.
5. Відтворити панель з низкою різних пептидів та епітопів.

## РОЗДІЛ 1

### ХАРАКТЕРНІ ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ ВІРУСОСПЕЦИФІЧНОЇ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ

#### 1.1. Формування вродженого та набутого імунітету

Класично імунну відповідь людини поділяють на вроджену та адаптивну. Перша реагує на патогени швидко і неспецифічно, тоді як друга реагує повільніше, але специфічно, з формуванням довготривалої імунологічної пам'яті. Ця розбіжність продиктувала останні півстоліття імунологічних досліджень, і величезна кількість робіт визначила клітинні та молекулярні складові компоненти кожного з цих двох основних компонентів захисту організму [1]. Вроджений імунітет опосередковується популяціями вроджених імунних клітин, таких як мієлоїдні клітини, природні кілери (NK) і вроджені лімфоїдні клітини (але за певних обставин також і неімунні клітини), а також гуморальними чинниками, такими як дефензини і система комплементу. Адаптивний або набутий імунітет є відносно новою еволюційною ознакою, що базується на сімействі імуноглобулінів і таких клітинах, як В- і Т-лімфоцити у хребетних, а також на варіабельних лімфоцитарних рецепторах (VLR), що складаються з сегментів, багатих на лейцин (LRR), у безщелепних хребетних тварин. Під час інфекції першим спрацьовує вроджений імунітет (запальна реакція), який повністю активується не пізніше, ніж за кілька хвилин або годин. Це має вирішальне значення для захисту організму на першій фазі нової інфекції [2].

Ключовою функцією вродженого імунітету є швидке залучення імунних клітин до вогнищ інфекції та запалення шляхом синтезу цитокінів і хемокінів (невеликих білків, що беруть участь у міжклітинній комунікації та залученні клітин). Утворення цитокінів під час вродженого імунітету мобілізує багато

захисних механізмів по всьому організму, а також активує місцеві клітинні реакції на інфекцію або травму. Ключовими запальними цитокинами, що вивільняються під час ранньої відповіді на бактеріальну інфекцію, є: фактор некрозу пухлин (TNF), інтерлейкін 1 (IL-1) та інтерлейкін 6 (IL-6). Ці цитокини є критично важливими для ініціювання рекрутування клітин і місцевого запалення, яке є необхідним для знищення багатьох патогенів [1,2,3,4].

Хоча вроджений імунітет, як правило, здатний ефективно усувати патогени, початковий захист від інфекції може не спрацювати через велику кількість або вірулентність патогенів, що потрапили в організм. У цих ситуаціях активується адаптивна ланка імунітету, що дозволяє специфічно розпізнати та елімінувати патоген. Формування адаптивного імунітету триває 1-2 тижні і є важливим для захисту організму на пізніх стадіях інфекції та при вторинних інфекціях завдяки здатності "запам'ятовувати" та ефективніше реагувати на повторне інфікування [1].

Вроджений та адаптивний імунні процеси спочатку розглядалися як відносно відокремлені в часі реакції, але дослідження останніх двох десятиліть чітко продемонстрували міцні зв'язки та ефективну мережу між ними. Активація адаптивної імунної відповіді та індукція класичної імунної пам'яті в лімфоцитах залежить від вродженої імунної системи, зокрема від антигенпрезентуючих клітин, таких як дендритні клітини. Подальші ефекти активації лімфоцитів здійснюються шляхом посилення вроджених імунних реакцій, таких як фагоцитоз і знищення патогенів певними клітинами вродженого імунітету. Двома властивостями, які розрізняють вроджений та адаптивний імунітет, є, з одного боку, специфічність, а з іншого - здатність до формування довготривалої імунологічної пам'яті. Традиційно вважається, що вроджений імунітет є неспецифічним і не має здатності до адаптації, тоді як адаптивний імунітет з високою точністю розпізнає різні патогени, використовуючи процеси генної рекомбінації в сімействі генів імуноглобулінів, і в подальшому формує імунологічну пам'ять [1,4].

Вроджена імунна відповідь - це еволюційно сформована система захисних реакцій з кількома ключовими особливостями, які є спільними для різних живих організмів. Вона охоплює практично всі тканини і включає клітини як гемопоетичного, так і негемопоетичного походження. До кровотворних клітин належать макрофаги, тучні клітини, нейтрофіли, еозинофіли, дендритні клітини та природні кілери. Ці клітини мають рецептори розпізнавання, заковані в статевих клітинах, та активуються під час запальної реакції і диференціюються в короткоживучі ефекторні клітини для знищення інфекції. Негемопоетичні компоненти включають шкіру та епітеліальні клітини, що вистилають шлунково-кишковий, сечостатевий та дихальний тракти. Чужорідні мікроорганізми в цих тканинах можуть стати збудниками інфекції, наприклад, у випадку порізу або відкритої рани. Супутні збудники також можуть бути патогенними, коли антибіотики вбивають більшість або всі мікроорганізми і відбувається надмірний ріст патогенних штамів бактерій. Клітинний захист доповнюється гуморальними компонентами, які включають білки комплементу, С-реактивний білок, білок, що зв'язує ліпополісахариди (LPS), інші пентраксини, колектини та антимікробні пептиди, в тому числі дефензини. Циркулюючі білки вродженої імунної системи розпізнають збудників інфекцій і допомагають ефекторним механізмам полегшити їх усунення [5,6].

До швидко реагуючих типів клітин вродженого імунітету належать гранулоцити (поліморфноядерні клітини), тучні клітини, макрофаги та дендритні клітини. Тучні клітини найбільш відомі своєю здатністю швидко вивільняти гранули гістаміну і гепарину у відповідь на інфекцію. Ця швидка реакція може бути важливою для ініціювання запалення і загоєння ран, але також бере участь в алергічних реакціях. Гранулоцити включають групу з трьох типів клітин, що розрізняються за вмістом їхніх гранул: нейтрофіли, базофіли та еозинофіли. Всі три типи відносно короткоживучі (~5 днів), але є важливими ранніми реакціями на паразитів, позаклітинні бактерії та пухлини. Ранній

прихід гранулоцитів під час інфекції викликає гостре запалення рани і розширення навколишніх кровоносних судин, що забезпечує швидкий приплив інших імунних клітин. Нейтрофіли мають особливе значення, оскільки вони складають близько половини циркулюючих лейкоцитів в організмі людини і мають високу здатність до фагоцитозу і знищення чужорідних мікроорганізмів [7].

Впродовж перших годин і днів інфекції інвазія патогенів викликає активацію клітин вродженого імунітету, таких як макрофаги, моноцити, НК-клітини або гуморальні фактори, такі як система комплементу. Ці шляхи активують посилену запальну реакцію і ліквідують патогени (вроджений імунітет). У тих небагатьох випадках, коли інфекція не усувається, патогени потрапляють в організм і опрацьовуються антигенпрезентуючими клітинами, після чого відбувається презентація антигену і стимуляція специфічної активації Т- і В-лімфоцитів. У свою чергу, це призводить до клональної експансії та активації ефektorних механізмів (наприклад, вивільнення цитокінів, імуноглобулінів – адаптивний імунітет) [8].

## **1.2. Класифікація Т-клітин та механізм розвитку імунної пам'яті**

Т-клітини відіграють невід'ємну роль в імунному захисті організму проти патогенних мікроорганізмів і, після усунення загрози інфекції, Т-клітини пам'яті сприяють посиленому імунологічному нагляду та реагують на повторне зараження (імунологічна пам'ять) [9].

Т-клітини пам'яті CD8<sup>+</sup> є основним компонентом імунної системи проти внутрішньоклітинних патогенів, таких як віруси. Вони відрізняються здатністю до тривалого виживання, швидкої та потужної проліферації та набувають ефektorної функції при повторному впливі антигену. Можуть відрізнитися за фенотипом, локалізацією та функціями, що дозволяє їм

захищати організм від широкого спектру потенційних уражень. CD8<sup>+</sup> Т-клітини можуть опосередковувати знищення інфікованих клітин за допомогою багатьох механізмів, включаючи експресію гранзимів і перфोरину та секрецію цитокінів, таких як інтерферон- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) і фактор некрозу пухлин (TNF). На відміну від нейтралізуючих антитіл, які в основному розпізнають білки, що експресуються на поверхні патогенів, CD8<sup>+</sup> Т-клітини реагують на пептидні послідовності, представлені на поверхні антигенпрезентуючих клітин. Це забезпечує розпізнавання власних білків збудника, які менше піддаються тиску і, таким чином, мають схильність до більшої мінливості між різними варіантами патогену, ніж зовнішні білки збудника. Таким чином, CD8<sup>+</sup> Т-клітини мають потенціал для забезпечення широкого реактивного захисту від вірусів [9,10].

Серед CD8<sup>+</sup> Т-клітин існує значна гетерогенність, їх зазвичай поділяють на тканинні Т-клітини пам'яті (T<sub>RM</sub>), ефекторні Т-клітини пам'яті (T<sub>EM</sub>) та центральні Т-клітини пам'яті (T<sub>CM</sub>). Завдяки різній локалізації, здатності до запам'ятовування та ефекторним функціям вони забезпечують кілька рівнів захисту від потенційної реінфекції [11].

T<sub>RM</sub>-клітини розташовані в слизових оболонках, зокрема в легенях, шкірі та репродуктивних органах, і є унікальними серед популяцій Т-лімфоцитів пам'яті, оскільки вони не повертаються в кровообіг повторно. Вони характеризуються високою експресією CD69 і CD103 (також відомих як  $\alpha$ E-інтегрин) і діють як "вартів", забезпечуючи миттєвий захист при локальному вторинному інфікуванні за допомогою прямих ефекторних функцій, а також вербуванню і реактивації імунних клітин [11,12,13]. Основним аспектом функцій T<sub>RM</sub> є їхня локалізація в місцях попереднього інфікування, де вони готові швидко реагувати на повторну зустріч із патогеном. Як мишачі, так і людські T<sub>RM</sub> проліферують після реактивації і вивільняють ефекторні цитокіни та цитотоксичні медіатори, включаючи IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , перфорин і гранзим. Завдяки моделям мишей продемонстровано, що ці фактори мають прямі

цитотоксичні функції, а також слугують для залучення додаткових імунних клітин (включаючи DCs, макрофаги, NK-клітини та циркулюючі Т-клітини) та загального посилення місцевого тканинного імунітету [9].

T<sub>EM</sub>-клітини можуть мігрувати між тканинами і вторинними лімфоїдними органами та забезпечувати імунний нагляд. T<sub>EM</sub>-клітини володіють конститутивною експресією деяких ефektorних функцій і не експресують CD62L (також відомий як L-селектин) і CC-хемокіновий рецептор 7 (CCR7) [14].

Клітини T<sub>CM</sub> знаходяться у вторинних лімфоїдних органах і, як правило, характеризуються експресією CD62L і CCR7, які необхідні для проникнення в них. Вони мають найбільший проліферативний потенціал серед підмножин Т-лімфоцитів пам'яті і можуть швидко розмножуватися і диференціюватися після повторного контакту з інфекцією [13,14].

Т-лімфоцити пам'яті походять від наївних Т-лімфоцитів, які проліферують у відповідь на чужорідні антигени. Кожна нова CD4<sup>+</sup> Т-клітина виробляє унікальний  $\alpha$ - $\beta$  TCR в тимусі шляхом соматичної рекомбінації сегментів гена TCR. Лігандами для TCR на CD4<sup>+</sup> Т-клітинах є пептиди, зв'язані з молекулами головного комплексу гістосумісності класу II (МНСII). Ці ліганди генеруються клітинами, що експресують МНСII, які поглинають позаклітинні білки в ендосоми або фагосоми, де катепсини розщеплюють інтерналізовані білки на пептиди. Ці везикули також містять нещодавно синтезовані молекули МНСII, які зв'язують пептиди через дев'ять амінокислотних послідовностей ядра з певними ключовими залишками. Потім пептидні комплекси МНСII транспортуються до поверхні клітини [15].

CD4<sup>+</sup> Т-хелпери (Th) відіграють центральну роль в імунній системі і виконують безліч функцій, включаючи активацію, координацію, модуляцію і регуляцію вроджених і адаптивних імунних реакцій. Ці різноманітні функції Th-клітин необхідні для досягнення ефективною імунною відповіді проти різноманітних патогенів, зберігаючи при цьому стійкість організму та

уникаючи небажаних атак проти власних тканин. Регуляція імунної відповіді Th-клітинами здійснюється шляхом секреції специфічних цитокінів, які разом з фактором транскрипції визначають відповідну підгрупу Th-клітин та її спеціалізовані функції і властивості. Функція ефektorних Th-клітин добре вивчена, тоді як роль і біологія Т-лімфоцитів пам'яті CD4<sup>+</sup> є більш складною і менш дослідженою. Більше того, функція CD4<sup>+</sup> Т-клітин пам'яті у формуванні імунної відповіді може лише частково визначатися підмножиною Th-лімфоцитів-попередників, з якої виникла первинна імунна відповідь [15,16].

Слідом за імунізацією CD4<sup>+</sup> Т-клітини необхідні для розвитку первинної імунної відповіді CD8<sup>+</sup> Т-клітин як за кількістю, так і за функціональністю. Крім того, CD8<sup>+</sup> Т-клітини, які диференціюються за відсутності допомоги CD4<sup>+</sup> Т-клітин, погіршують своє довгострокове виживання і демонструють низьку проліферативну здатність після повторного виклику [11,17].

Механізм, за допомогою якого CD4<sup>+</sup> Т-клітини підтримують відповідь CD8<sup>+</sup> Т-клітин після імунізації, полягає в залученні дендритних клітин (DCs). Допомога CD4<sup>+</sup> Т-клітин необхідна для підвищення антигенпрезентуючої та костимулюючої здатності DCs до рівня, достатнього для індукції потужної ефektorної відповіді CD8<sup>+</sup> Т-клітин, оскільки і CD4<sup>+</sup> Т-клітини, і CD8<sup>+</sup> Т-клітини розпізнають антиген, представлений одними і тими ж DCs [11,18]. Це опосередковується через взаємодію CD40-CD40ліганд (CD40L) між DCs і спорідненими CD4<sup>+</sup> Т-клітинами, що забезпечує функціональне дозрівання DCs [11].

Паралельно з первинною відповіддю, CD4<sup>+</sup> Т-клітини відіграють важливу роль у регуляції розміру, фенотипу та функціонування популяції CD8<sup>+</sup> Т-клітин пам'яті. Механізм, який, як припускають, забезпечує цю потребу, полягає в регуляції ліганду, що індукує апоптоз, пов'язаний з TNF (TRAIL). "Вразливі" CD8<sup>+</sup> Т-клітини швидко індукують експресію TRAIL при повторній стимуляції і зазнають апоптозу [19].

Важливим під час праймінгу є також виділення IL-2 для формування вторинної відповіді CD8<sup>+</sup> Т-клітин. CD4<sup>+</sup> Т-клітини вважаються основним джерелом IL-2. Завдяки IL-2 CD8<sup>+</sup> Т-клітини індукують експресію NGFI-A-зв'язуючого білка 2 (NAB2), що опосередковує пригнічення експресії TRAIL і забезпечує вторинну індукцію цих клітин. Також DCs продукують IL-12p70, який діє безпосередньо на антиген-специфічні CD8<sup>+</sup> Т-клітини, збільшуючи експресію ними CD25 (також відомого як IL-2R $\alpha$ ), що робить ці клітини більш чутливими до IL-2 [20].

### 1.3. Шляхи активації Т-клітин

Первинна активація Т-лімфоцитів суворо регулюється і вимагає трьох послідовних сигналів: 1-й сигнал - розпізнавання TCR спорідненого антигену в складі МНС; 2-й сигнал - зв'язування коstimулюючих молекул; 3-й сигнал - присутність цитокінів, які спрямовують і посилюють диференціацію та збільшення кількості Т-лімфоцитів. Відсутність коstimуляції (сигнал 2) після розпізнавання антигену (сигнал 1), як було доведено, призводить до анергії та/або толерантності [21,22].

На незрілих DC присутні кодовані зародковою лінією рецептори розпізнавання патернів (PPR), специфічні до патоген-асоційованих патернів (РАМ). Залучення цих мембранозв'язаних рецепторів запускає дозрівання DC і призводить до посилення регуляції коstimулюючих молекул. Зрілі DC у мишей експресують CCR7 і починають мігрувати в регіональні лімфатичні вузли після зустрічі з антигеном [23].

При ідентифікації патоген-асоційованих сигналів DC проходять ряд функціональних змін для дозрівання. Зрілі DC презентують молекулу антигену в складі МНС рецепторам Т-клітин та експресують ко-стимулюючі молекули CD40 і B7. Зрілі DC характеризуються продукцією цитокінів, таких як IL-12,

та експресією рецепторів самонаведення, таких як CCR7, які спрямовують міграцію DC у Т-клітинні зони вторинних лімфоїдних органів. Разом ці зміни дозволяють DC ефективно активувати наївні Т-клітини. Водночас DC індукують експресію відповідних костимулюючих молекул CD40L, CD28 на Т-клітинах. Зрілі DC сприяють диференціації наївних Т-клітин у Th1, Th2, Th17 або Treg-клітини у стимул-залежний спосіб шляхом секреції цитокінів [23,24,25].

Взаємодія між Т-клітинами і DC призводить до формування імунологічного синапсу (IS) і підтримується високо експресуючими молекулами адгезії (LFA-1, LFA-3, ICAM-1, ICAM-2), цитокінами і хемокінами [25,26].

Поєднання TCR і комплексу пептид-МНС (сигнал 1) призводить до фосфорилування тирозинзалежного модуля активації імунорецепторів (ITAM) на CD3, який тісно прилягає до TCR, за допомогою Lck-кінази. Т-клітини отримують сигнал-1, коли каскад активації призводить до передачі сигналу через кілька TCR протягом декількох годин. Ця тривала сигналізація необхідна для ефективної активації шляхів передачі сигналу, які призводять до активації факторів транскрипції. Саме кластеризація TCR в IS на межі між Т-клітинами і DC необхідна для безперервної сигнальної трансдукції. Сигнал-2 ініціюється взаємодією костимулюючих молекул, що експресуються DC і Т-клітинами. Були ідентифіковані позитивні сигнали, такі як CD28/B7-1 (CD80) і CD28/B7-2 (CD86), і негативні сигнали, такі як CTLA-4/CD80 і CTLA-4/CD86). Як згадувалося вище, пари костимулюючих молекул (CD80/CD28, LFA-1/ICAM-1 або ICAM2, CD2/LFA-3) забезпечують сигнал 2 [23,27]. Сигнал активації цих костимулюючих молекул доставляється до Т-клітин через ITAM цитоплазматичного домену, що посилює Т-лімфоцитарну відповідь на антиген. Це була двосигнальна модель активації Т-клітин. Т-клітини можуть активуватися при одночасному отриманні сигналу-1 від розпізнавання антигену Т-клітинами і сигналу-2 від костимулюючої молекули. Однак, якщо

Т-клітини отримують лише сигнал-1, вони вимикаються, і Т-клітини переходять у стан толерантності, клонової недієздатності або знищення [27,28].

CD28/CD80 - це пара костимулюючих молекул, які опосередковують і посилюють імунну відповідь, але ці молекули не беруть безпосередньої участі в формуванні імунної пам'яті. Також костимулюючий сигнал CD28 був пов'язаний в основному з ініціюванням взаємодії між DC і Т-клітинами. Сигнал CD28/CD80 стимулює Т-клітини до експресії багатьох інших костимулюючих молекул, які контролюють баланс імунної відповіді та стабільність внутрішнього середовища. Взаємодія між цитотоксичними Т-лімфоцитами (CTL) і Th- або Th- і В-клітинами ґрунтується на інших костимулюючих молекулах, таких як OX40 (CD134), ICOS. Костимуляторна молекула 4-1BB та її ліганд 4-1BBL можуть контролювати адаптивний імунітет [29]. Treg-клітини підвищують експресію 4-1BB у відповідь на дію IL-2 та пригнічення проліферації Т-клітин. У той же час, взаємодія 4-1BB і сигналу CD28 може впливати на поляризацію клітин і сприяти диференціюванню Th0-клітин у Th1-клітини, які характеризуються продукцією IFN-гамма [30].

CTLA-4 (CD152) гомологічний CD28 і також експресується на активованих Т-клітинах, але цитоплазматичний домен CTLA-4 має імунорецепторний тирозинзалежний інгібуючий модуль (ITIM). Таким чином, CTLA-4 зв'язується з CD80 в конкурентній боротьбі з CD28 з афінністю, яка в 20 разів вища, ніж CD28/CD80, і може передавати інгібуючий сигнал активованим Т-клітинам через свій ITIM для відновлення балансу імунної відповіді. CTLA-4 активує білкову тирозинфосфатазу (РТР) через структуру ITIM та інгібує передачу сигналу активації Т-клітин, що призводить до негативної регуляції активації Т-клітин. Крім того, CTLA-4 пригнічує експресію альфа-ланцюга рецептора IL-2, секрецію IL-2 та накопичення мРНК IL-2, що також призводить до пригнічення активації Т-клітин у мишачих моделях. Таким чином, костимулюючі сигнали, опосередковані

костимулюючими молекулами, включаючи позитивні та негативні сигнали, відіграють важливу роль у регуляції взаємодії між Т-клітинами та DC і підтримці балансу імунної відповіді [28].

Після того, як Т-клітина отримала сигнал специфічного антигену і загальний сигнал два, вона отримує додаткові інструкції у вигляді цитокінів. Вони визначають, яким саме типом клітини-відповідача вона стане - у випадку з Т-хелперами це підштовхне їх до типу Th1 (клітини, що піддаються впливу цитокіну IL-12, Th2 (IL-4) або IL-17 (IL-6, IL-23). Кожна з цих клітин виконує певне завдання в тканині і в розвитку подальших імунних реакцій [31].

Сформована популяція клітин рухається до місця інфекції або запалення, щоб боротися з патогеном. Інші клітини, присутні в місці запалення, такі як нейтрофіли, тучні клітини та епітеліальні клітини, також можуть вивільняти цитокіни, хемокіни, короткі пептиди та інші молекули, які індують подальшу активацію та проліферацію Т-лімфоцитів [28,29,31].

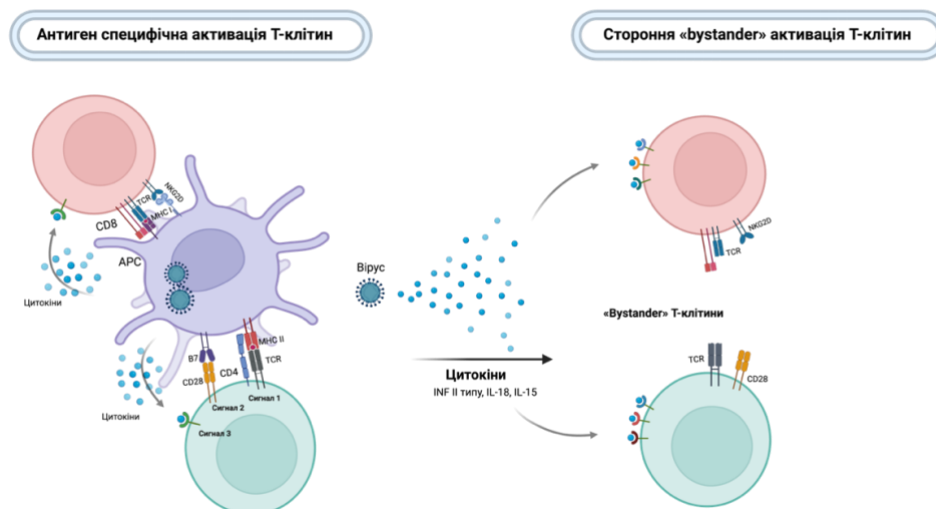
### **1.3.1. Стороння «Bystander» Т-клітинна активація**

Під час вірусних інфекцій значна кількість Т-лімфоцитів активується цитокін-залежним способом - це явище називається сторонньою «bystander» активацією. Активація TCR не впливає на цей процес. Цитокіни, включаючи INF I типу, IL-18 та IL-15, є найважливішими факторами, що індують сторонню активацію Т-лімфоцитів, кожен з яких відіграє дещо відмінну роль. «Bystander» Т-клітини не мають специфічності до збудника, але, тим не менш, можуть впливати на перебіг імунної відповіді щодо інфекції. Наприклад, активовані «bystander» CD8<sup>+</sup> Т-клітини можуть брати участь у захисному імунітеті, секретуючи цитокіни, такі як INF- $\gamma$ . Вони також опосередковують пошкодження тканин хазяїна, проявляючи цитотоксичність, яка полегшується

природними рецепторами, що активують кілерні клітини, такими як NKG2D, і цитолітичними молекулами, такими як гранзим В.

Цитокини, які індукують активацію «bystander» клітин, зазвичай співпадають з тими, що регулюють активацію антиген-специфічних CD8<sup>+</sup> Т-клітин. Зокрема, вроджені запальні цитокини мають вирішальне значення для індукції активації «bystander» клітин під час інфекції. PAMP, що сигналізують через Toll-подібні рецептори (TLR), також подають важливі сигнали для активації «bystander» клітин [32].

Механізм імунної «bystander» активації CD8<sup>+</sup> Т-клітин пам'яті за допомогою IFNs I типу невідомий. Коли антиген-специфічні CD8<sup>+</sup> Т-клітини пам'яті піддаються впливу IFN I типу *in vitro*, вони не демонструють значної функціональної активації, без присутності цитокінів, таких як IL-18. Цей результат свідчить про те, що IFN I типу потребує додаткових вторинних сигналів або допоміжних клітин для повної активації «bystander» Т-клітин. Відповідно, сигнал IFN I типу може індукувати продукцію IL-15 додатковими клітинами і підвищувати чутливість Т-клітин до IL-18. Як IL-15, так і IL-18 є важливими медіаторами активації «bystander» Т-клітин [33].



**Рис. 1.1.** Загальна схема двох шляхів активації Т-клітин

IL-18, член сімейства цитокінів IL-1, є одним з найбільш добре вивчених цитокінів, які індукують антиген-незалежну продукцію IFN- $\gamma$  ефекторними T-клітинами і T-клітинами пам'яті CD8<sup>+</sup> під час мікробних інфекцій. CD8<sup>+</sup> T-клітини, які піддаються впливу різних комбінацій цитокінів, включаючи IFN I типу та IL-18, демонструють активацію (наприклад, CD69<sup>+</sup>) та високий рівень продукції IFN- $\gamma$ 39. Крім того, дослідження *in vitro* та на моделях інфекцій у мишей продемонстрували значний синергізм між IL-18 та іншими прозапальними цитокінами (наприклад, IL-12, IL-2, IL-15 та IL-21) для індукції антиген-неспецифічної продукції IFN- $\gamma$ . Таким чином, виявляється, що IL-18 взаємодіє з широким спектром цитокінів у запальному середовищі, щоб індукувати сторонню «bystander» активацію T-лімфоцитів [34].

IL-15, представник сімейства цитокінів із спільним  $\gamma$ -ланцюгом, є ще одним ключовим фактором, що бере участь в опосередкованій сторонній активації CD8<sup>+</sup> T-клітин як у мишей, так і у людини. Показано, що IL-15 функціонує в різних аспектах життєдіяльності імунної системи, включаючи розвиток NK та інваріантних NK T (iNKT) клітин, активацію NK-клітин та гомеостатичну підтримку CD8<sup>+</sup> T-клітин пам'яті. При таких патологічних станах, як аутоімунна гемолітична анемія та нелікована ВІЛ-1 інфекція, рівень IL-15 підвищений у сироватці крові та лімфатичних вузлах відповідно. Це свідчить про те, що IL-15 стимулює сторонню «bystander» активацію CD8<sup>+</sup> T-клітин при наявності патології [35].

Відмінною особливістю IL-15 від IL-18 є те, що він наділяє цитолітичною здатністю CD8<sup>+</sup> T-клітини пам'яті, яка може бути ініційована NK-активуючими рецепторами, такими як NKG2D. Це явище називають "вродженою (або NK-подібною) цитотоксичністю". Крім того, IL-15 сприяє експресії цитолітичних молекул (наприклад, гранзиму В і перфोरину) [36].

#### 1.4. Імунна відповідь на вірусні інфекції

Відомо, що коронавіруси ("CoVs") - це представники родини Coronaviridae, які мають позитивно поляризовану одноланцюгову РНК. Останніми роками CoVs стали глобальною проблемою для громадської охорони здоров'я.

У людей, інфікованих SARS-CoV-2, спостерігається широкий спектр клінічних симптомів - від легкого перебігу хвороби до гострої пневмонії. Загалом, COVID-19 можна виділити три стадії: стадія 1 - безсимптомний стан, стадія 2 - реакції з боку верхніх дихальних шляхів, стадія 3 - гіпоксія та прогресування до гострої пневмонії. На стадії 1 (перші два дні інфекції) пацієнти мають безсимптомний перебіг, але є контагіозними. Схоже, що в дихальних шляхах вірус зв'язується з епітеліальними клітинами в носовій порожнині протягом перших двох днів і починає реплікуватися. Ця локальна проліферація вірусу здатна викликати обмежену вроджену імунну відповідь. Хоча вірусне навантаження в перші дні інфекції зазвичай низьке, SARS-CoV-2 можна виявити за допомогою мазків з носа та горла, і це може бути цінним для прогнозування подальшого клінічного перебігу [37]. Протягом наступних кількох днів (стадія 2) вірус мігрує в нижні дихальні шляхи і все більше викликає вроджені імунні реакції. На стадії 2 можна чітко спостерігати клінічні прояви хвороби COVID-19 [38]. Деякі цитокіни вродженої відповіді (наприклад, CXCL10) можуть бути корисними прогностичними маркерами подальшої активності інфекції та клінічного перебігу. Зазвичай понад 80 % інфікованих людей мають легкі симптоми і повинні спостерігатися вдома, але майже у 20 % з них хвороба прогресує до 3 стадії і навіть розвивається гостра пневмонія. За первинними оцінками, смертність від COVID-19 у загальній популяції становить близько 2%, але цей показник помітно варіює серед людей похилого віку та осіб із супутніми захворюваннями [37,38].

SARS-CoV-2 (COVID-19) - це сферичні або плеоморфні оболонкові частинки, які містять одноланцюгову РНК розміром приблизно 29,9 кб. Серед усіх відомих РНК-вірусів коронавіруси мають найбільші геноми (26,4-31,7 кб) [39]. Як і інші коронавіруси, цей вірус має щонайменше шість додаткових відкритих рамок зчитування (ORF) у своєму геномі. ORF1a/b складають близько двох третин довжини всього геному. Ці ORFs продукують два поліпептиди, включаючи р1a і рp1ab. Третина геному біля 3'-кінця кодує чотири основні структурні білки, включаючи нуклеокапсид, шип, оболонку та мембранні білки. Білок-нуклеокапсид утримує геном вірусу, а три інші білки утворюють вірусну оболонку. Спайкові білки, що покривають зовнішню поверхню SARS-CoV-2, відіграють ключову роль у розпізнаванні клітин господаря і дозволяють вірусу закріпитися і злитися з їхньою мембраною. Ці білки містять варіабельний рецептор-зв'язуючий домен (RBD), який зв'язується з рецепторами ACE-2, що знаходяться в дихальній системі, шлунково-кишковому тракті, серці та нирках [40]. Після цього вірус прикріплюється до клітини господаря, протеази всередині клітини починають розщеплювати спайковий білок вірусу. Згодом РНК вірусу вивільняється в клітину, і клітина змушена продукувати більше копій вірусу, які широко розповсюджуються в організмі, інфікуючи більшу кількість клітин. Цей вірус виробляє деякі фактори вірулентності, які здатні пригнічувати імунну відповідь [41].

Геном SARS-CoV-2 є досить значним - ~30-кб, тому не дивно, що він кодує багато епітопів Т-клітин. На сьогоднішній день ідентифіковано понад 1400 потенційних епітопів. З'являються геномні регіони імунодомінування, а також визначені пептидні епітопи, які є спільними для донорів, в тому числі в межах рецептор-зв'язуючого домену (RBD). Більше того, імунодомінантні пептиди також можуть бути отримані з відкритої послідовності рамки зчитування послідовності, яка не охоплює сучасні схеми вакцин [38].

Клітини вродженого імунітету експресують рецептори розпізнавання патогенів (PRRs) для розпізнавання патоген-асоційованої молекулярної структури (PAMP), що включає лектинові рецептори С-типу, NOD-подібні рецептори (NLRs), RIG-I-подібні рецептори (RLRs) і Toll-подібні рецептори (TLRs). РНК-віруси, такі як коронавірус, розпізнаються цитозольними та ендосомальними РНК-сенсорами, включаючи RIG-I та TLRs (TLR2, TLR3 та TLR7) відповідно. Показано, що активація TLR3 за допомогою поліінозин-поліцитидилової кислоти (poly I:C) може пригнічувати інфекцію, пов'язану з коронавірусом. Розпізнавання РНК вірусу TLRs і RIG-1 призводить до активації факторів транскрипції, ядерного фактора NF- $\kappa$ B і регуляторного фактора інтерферону 3 (IRF3), що призводить до транслокації в ядро та індукції експресії прозапальних цитокінів, хемокінів і IFN I типу [42].

Вважається, що IFN I типу є першою противірусною захисною лінією. IFN I типу через рецептор IFN $\alpha/\beta$  (IFNAR) активує янус-кіназу (JAK), сигнальний механізм передачі сигналу та активатор транскрипції (STAT). Після отримання сигналу від IFNAR - JAK1 і TYK2 фосфорилують молекули STAT1 і STAT2, які утворюють комплекс з IRF 9 . Ці комплекси потрапляють в ядро для стимуляції транскрипції IFN-стимульованих генів (ISGs) і, як наслідок, подальшої експресії противірусних білків. Ряд продуктів ISG, включаючи IFN-індуковані трансмембранні (IFITMs) білки 1, 2 і 3, обмежують інфекцію, опосередковану SARS-CoV [43].

Більше того, еозинофіли та природні кілери (NK) мають противірусну активність. Еозинофіли обмежують респіраторно-синцитіальний вірус (PCV), спричинений запаленням легенів, завдяки виробленню оксиду азоту (NO) за допомогою синтази оксиду азоту 2 (NOS-2). NK-клітини експресують різні рецептори до МНС класу I, які можуть пригнічувати або активувати продукцію цитокінів або клітинну цитотоксичність. NKG2D є одним з активуючих рецепторів, який посилює продукцію цитокінів, секрецію хемокінів і

цитолітичну активність NK-клітин. CXCL10 індукує вроджені імунні відповіді, включаючи NK-клітини, після вірусної інфекції [42,43,44].

#### **1.4.1. Формування набутої вірусоспецифічної імунної відповіді**

T-лімфоцити, CD4<sup>+</sup> і CD8<sup>+</sup> T-клітини відіграють важливу роль у протидії вірусу, сприяючи секреції патоген-специфічних антитіл, індукуючи T-залежні B-клітини та знищуючи інфіковані вірусом клітини відповідно. Хоча вірусоспецифічні CD4<sup>+</sup> T-клітини важливі для повного кліренсу вірусу, вірусоспецифічні CD8<sup>+</sup> T-клітини пам'яті відіграють важливу роль у захисті хазяїна від летальної інфекції SARS-CoV шляхом продукції численних цитокінів (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  та IL-2) та цитолітичних молекул (гранзиму V).

COVID-19 вважають хворобою типу "цитокінового шторму". Цитокіни, включаючи TNF- $\alpha$ , IL-6 та IL-10, можуть сприяти некрозу або апоптозу T-лімфоцитів, що призводить до їх зменшення. Зменшення кількості T-лімфоцитів індукує виживання вірусу та пролонгує коронавірусну інфекцію. Крім того, при вивільненні цитокінів T-хелперів (Th) 17, таких як IL-17, надходять моноцити і нейтрофіли до місця запалення або інфекції та активують інші наступні каскади хемокінів і цитокінів, такі як TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL8 і MCP-1. При COVID-19 кількість CCR6<sup>+</sup> Th17 клітин збільшується і сприяє цитокіновому шторму, що призводить до набряку легень і пошкодження тканин.

CD4<sup>+</sup> T-клітини швидко стають патогенними лімфоцитами Th1 і виробляють цитокін гранулоцитарно-колонієстимулюючий фактор (G-CSF). G-CSF бере участь у патогенезі інфекції COVID-19 та ініціює пошкодження тканин. CD4<sup>+</sup> та CD8<sup>+</sup> T-клітини пацієнтів з COVID-19 експресують високі рівні маркерів пригнічення, включаючи Tim-3 та PD-1 на клітинній поверхні.

Загалом, рівень Т-лімфоцитів знижений і функціонально виснажений при захворюваннях, пов'язаних з коронавірусом, і може бути пов'язаний з більш тяжкими симптомами або летальністю [44].

Антиген-специфічні CD8<sup>+</sup> Т-клітини проліферують і диференціюються в ефекторні клітини при зустрічі зі спорідненим антигеном на антигенпрезентуючих клітинах. Вони спрямовані на боротьбу з патогеном, вбиваючи інфіковані вірусом клітини-хазяїна. В результаті знищення вірусу 90-95% ефекторних Т-клітин зазнають апоптозу, тоді як деякі антиген-специфічні Т-клітини виживають і стають Т-клітинами довготривалої пам'яті, які здатні захищати організм від повторного інфікування тим самим збудником.

Антиген-специфічні відповіді ефекторних Т-клітин генеруються під час гострої інфекції SARS-CoV-2 і зберігаються протягом декількох місяців, однак наразі мало відомо про зміни фенотипів цих Т-клітин з плином часу. Завдяки попереднім дослідженням з використанням живих атенуєваних вірусних вакцин у здорових донорів було описано фенотипові траєкторії антиген-специфічних Т-клітинних популяцій людини. Наразі невідомо, чи викликає інфікування природним вірусом подібні реакції Т-лімфоцитів пам'яті у людини, оскільки шлях інфікування, вірусне навантаження, запалення та різні фактори, пов'язані з організмом хазяїна, можуть впливати на реакції Т-лімфоцитів та формування пам'яті [45].

Гуморальний імунітет необхідний для контролю над інфекціями, спричиненими CoV. При SARS-CoV профіль антитіл демонструє типову картину секреції IgM та IgG. Специфічні до SARS антитіла IgG можуть існувати довше, ніж IgM, що вказує на те, що антитіла IgG відіграють захисну роль [44].

### 1.5. Загальна характеристика МНС-мультимерів

Зазвичай Т-клітини забезпечують імунну відповідь на патогени шляхом розпізнавання чужорідних білкових антигенів у вигляді пептидів, представлених на поверхні клітини і зв'язаних з молекулами МНС. Ключ до розпізнавання лежить у гетеродимерному  $\alpha\beta$ -рецепторі Т-клітин (TCR), який у взаємодії з основним рецептором CD4 або CD8 залучає пептид-МНС (pMHC) для створення внутрішньоклітинного каскаду передачі, що призводить до активації Т-клітин [46].

МНС-мультимерами називають реагенти, що використовуються для виявлення та підрахунку антиген-специфічних Т-клітин (AST). Ці реагенти використовують механізм, за допомогою якого TCR на цитотоксичних CD8 Т-клітинах розпізнають специфічні антигени в контексті молекули МНС під час презентації антигену. МНС-мультимери - це флуоресцентно мічені декстранові полімери, що містять молекули МНС класу I та пептидні послідовності, які можуть бути модифіковані для представлення специфічних споріднених послідовностей антигену, що представляє інтерес. Декстрамери мають 10-кратну кратність комбінації МНС/пептид в межах одного мультимера. Зв'язування антиген-специфічних декстрамерів імітує презентацію антигену TCR і така взаємодія TCR на AST може бути достатньою для того, щоб викликати функціональну відповідь Т-клітин [47].

Хоча взаємодія TCR із спорідненим pMHC є короткочасною, цю взаємодію можна стабілізувати за допомогою «ефекту авідності», який забезпечується включенням кількох pMHC в одну молекулу. Цей ефект спочатку був використаний шляхом поєднання розчинного біотинільованого pMHC зі стрептавідином, кон'югованим із флуорохромом. Отримані мультимери pMHC можуть стабільно зв'язуватися зі спорідненими Т-клітинами в мононуклеарних клітинах периферичної крові (PBMC), щоб дозволити виявлення та фенотипування антиген-специфічних Т-клітин.

Використовувалися різні платформи мультимеризації рМНС, більшість з яких є комерційно доступними. Стандартне фарбування мультимером рМНС не дозволяє виявити повністю функціональні Т-клітини, які несуть TCR нижче межі виявлення. Цей недолік прискорив розробку різних методик, спрямованих на зниження порогу спорідненості TCR для мультимерного фарбування рМНС [46,47].

Перше з цих удосконалень передбачає включення 50 нМ дазатинібу, інгібітора протеїнкінази (PKI), щоб запобігти зниженню TCR. Крім того, ми включаємо антифлуорохромне антитіло (Ab) для перехресного зшивання мультимерів рМНС на поверхні Т-клітин. Таке перехресне зшивання може призвести до суттєвих покращень у фарбуванні мультимерів рМНС шляхом стабілізації зв'язування та обмеження дисоціації під час етапів промивання [46].

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Донори зразків

У загальне дослідження, що почалось у 2020 році, включена когорта із 175 пацієнтів із COVID-19, підтвердженим методом ПЛР у режимі реального часу (RT-PCR), зразки яких відібрали під час гострої симптоматичної фази та спостерігали через 6 місяців та 1 рік після інфікування. Для цього дослідження проведено типування людського лейкоцитарного антигену (HLA) у всіх пацієнтів і здорових контрольних осіб, а також у відібраних осіб, які несуть алелі HLA-A\*01:01, HLA-A\*11:01 або HLA-A\*24:02 (n = 47 пацієнтів і n = 13 здорових контрольних).

Для основної частини нашого дослідження провели типування HLA у здорових контрольних пацієнтах і відібрали носіїв алелів HLA-A\*02:01.

HLA-A \* 02:01 алель є одним з найпоширеніших алелів HLA класу I в глобальній популяції і тому часто використовується для фарбування МНС-декстрамерами. Цей алель особливо важливий для дослідження реакції CD8+ Т-клітин, оскільки він асоціюється з презентацією багатьох вірусних і пухлинних антигенів. Використання носіїв алелі HLA-A\*02:01 для фарбування МНС-декстрамера дозволяє дослідникам ідентифікувати та відстежувати антиген-специфічні CD8+ Т-клітини у зразках з різних популяцій. Крім того, оскільки реагенти МНС-декстрамер є специфічними до алелі HLA-A\*02:01, використання носіїв гарантує, що будь-яке позитивне фарбування обумовлене специфічним зв'язуванням декстрамера з цільовим пептид-МНС комплексом, а не неспецифічним зв'язуванням з іншими алелями.

Таким чином, використання носіїв алеля HLA-A\*02:01 для фарбування МНС-декстрамером є важливим етапом контролю якості, який забезпечує

специфічність і точність результатів фарбування, а також дозволяє надійно ідентифікувати і характеризувати антиген-специфічні CD8<sup>+</sup> Т-клітини.

Основна і контрольна групи хворих в обох дослідженнях були репрезентативні за віком, стадією захворювання, типу медичних втручань і схем лікування.

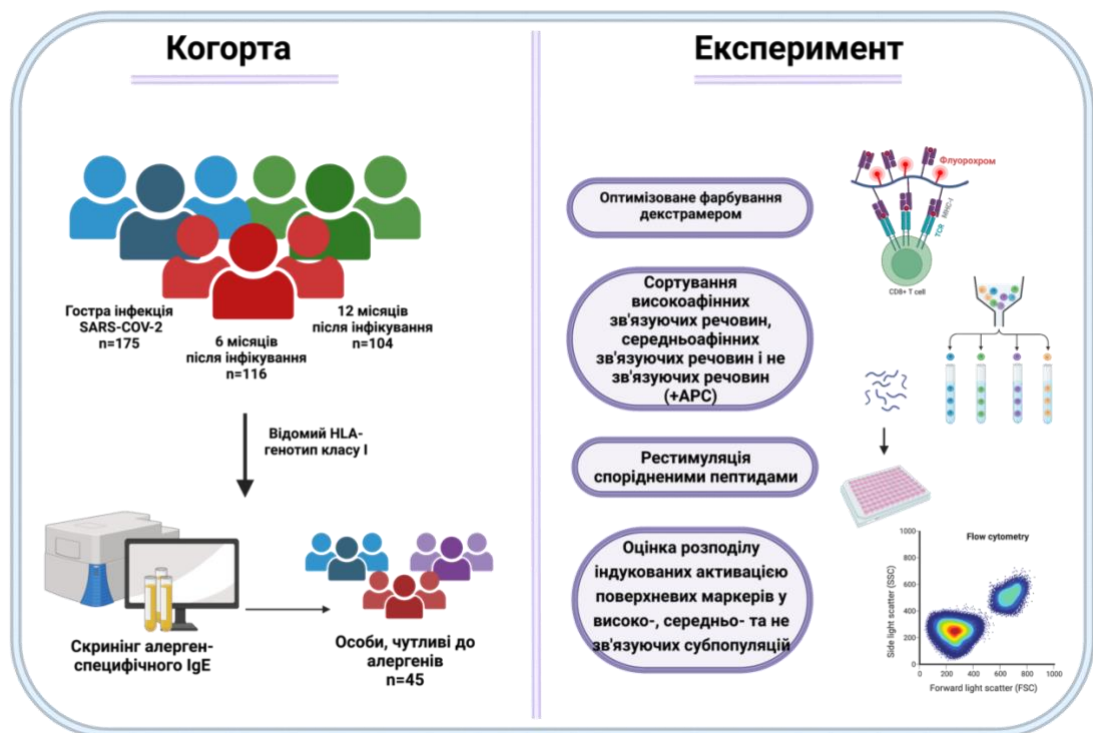


Рис. 2.1. Підхід до екперименту

Дослідження проводились згідно біоетичних норм, прийнятих швейцарським законодавством. Пацієнти були відібрані після отримання письмової інформованої згоди на відбір зразків крові, схваленої Кантональним етичним комітетом Цюріха, Швейцарія (BASEC #2016-01440).

Всі хворі були сповіщені про проведення досліджень і погодились на їх виконання. Діагноз був верифікований морфологічно.

### 2.1.1. Виділення PBMC

При створенні когорти для дослідження виділяли та ізолювали мононуклеарні клітин периферичної крові (PBMC). Венозну кров збирали у пробірки-вакутейнери з EDTA (BD Biosciences). Нашаровували кров на розчин фіколу для утворення ступінчастого градієнту щільності. Кров повинна відстоятися протягом 40-60 хв. при кімнатній температурі до чіткого розподілу еритроцитів та плазми. У центрифужну пробірку наливають 2-3 мл градієнта щільності, на нього нашарують 4-6 мл плазми, що відстоялася, і верхній шар еритроцитів. Співвідношення об'ємів градієнту: плазму витримують у межах 1:2 - 1:4. Пробірки центрифугують протягом 40 хв. і із уповільненням 0 об/хв. при температурі 20°C. На верхній межі градієнта при правильному розподілі утворюється кільце, що складається в основному з лімфоцитів та низькою концентрацією моноцитів після центрифугування. Після відмивання клітини підраховуються за допомогою камери Горяєва та заморожуються. Замороження аліквот відбувається 24 год при температурі -80°C, потім зберігаються у рідкому азоті при -170°C.

Аліквоти кількістю в п'ять мільйонів PBMC зберігали в 1 мл FBS, що містить 10% DMSO. Для подальшого аналізу зразки розморожували в попередньо підігрітому до 37 °C середовищі RPMI-1640, промивали PBS і фарбували на життєздатність за допомогою ZombieUV (Biolegend) в PBS, що містить реагент FcX Human TruStain FcX (Biolegend) протягом 30 хвилин при 4°C.

Клітини стимулювали single T-cell епітопним пептидом, що містить 9 амінокислот для кожного окремого епітопу. Зразки з DMSO використовували як негативний контроль. Клітини інкубували протягом 24 годин. Після інкубації клітини мітили сумішшю антитіл для ідентифікації потрібних маркерів.

Таблиця 2.1

**Моноклональні антитіла, мічені флуорохромом, використовуються для спектральної проточної цитофлуориметрії.**

Антиген	Флуорофор	Клон	Провайдер	№ каталогу	Розведення
CD56	BUV563	NCAM16.2	BD	612928	1:100
ICOS	BUV615	DX29	BD	751092	1:200
HLA-DR	BUV661	G46-6	BD	565074	1:100
PD1	BUV737	EH12.1	BD	612791	1:100
CD4	Pacific blue	SK3	Biologend	344620	1:100
CD14	BV510	M5E2	Biologend	301841	1:200
CD19	BV510	H1B19	Biologend	302242	1:50
4-1BB	BV650	4B4-1	Biologend	309827	1:100
CD8	BV711	SK1	Biologend	344733	1:100
CD45RA	FITC	HI100	Biologend	304106	1:100
CD69	Sp.Blue 550	FN50	Biologend	310965	1:100
CD25	PE-Cy5	BC96	Biologend	302608	1:100
CD127	PE-Fire700	A019D5	Biologend	351365	1:100
CD3	PE-Cy7	UCHT1	eBioscience	25-0038-42	1:200
TCRab	APC	IP26	Biologend	306717	1:100
CCR7	APCfire750	G043H7	Biologend	353245	1:50
L-selectin	APCfire810	DREG-56	Biologend	304866	1:100

Повний перелік мічених флуорохромом моноклональних антитіл (mAb) наведено в таблиці 2.1. Після відмивання зразки ресуспендували в PBS, що містив 1% FBS і 2 мМ ЕДТА, і реєстрували на спектральному проточному цитофлуориметрі Cytex Aurora з використанням програмного забезпечення SpectroFlo.

### **2.1.2. Фарбування МНС-мультимером**

МНС-мультимер - це молекула, яка складається з декількох копій білкового комплексу МНС, що відповідає за представлення антигенів Т-клітинам. Мультимер мічений флуоресцентним барвником і може специфічно зв'язуватися з Т-клітинами, які мають TCR, що розпізнає антиген, представлений білковим комплексом МНС.

Після типування за лейкоцитарним антигеном людини (HLA) класу I для оцінки вірусоспецифічних клітин були відібрані донори, що несуть алелі HLA-A\*02:01. Зразки PBMC розморожували в попередньо підігрітому середовищі RPMI-1640, відмивали та інкубували в PBS. Після відмивання клітини інкубували з мультимерами МНС-I, міченими PE. Специфічні до SARS-CoV-2 CD8<sup>+</sup> Т-клітини оцінювали за допомогою стимулюючих пептидів, нанесених на декстрамери HLA-A\*02:01, молекулярною масою в 1150.39 g/M (пептид, без врахування навантаження МНС), Пептиди, навантажені на пентамери HLA-A\*02:01, використовували для виявлення COVID-специфічних CD8<sup>+</sup> Т-клітин. Після інкубації з навантаженими пептидами МНС-мультимерами в PBS, додавали mAb для фарбування поверхневих маркерів. Фарбували внутрішньоклітинні маркери і обробляли зразки після відмивання, як описано вище.

## **2.2. Методи дослідження**

### **2.2.1. HLA-типування**

HLA-типування - це лабораторний метод аналізу, який використовується для розпізнавання генів людського лейкоцитарного антигену (HLA), що беруть участь у функціонуванні імунної системи і відіграють вирішальну роль у

трансплантації органів та сприйнятливості до хвороб. HLA-типування важливе при трансплантації органів, оскільки для успішної трансплантації необхідна тісна відповідність між генами HLA донора і реципієнта. HLA-типування також використовується для діагностики та моніторингу аутоімунних розладів, інфекційних та онкологічних захворювань.

Основний принцип роботи HLA-типування полягає у виділенні ДНК зі зразка (наприклад, крові або тканини), ампліфікації генів HLA за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та виявленні алелів HLA за допомогою секвенування або гібридизації.

На першому етапі ДНК виділяють зі зразка за допомогою набору для виділення ДНК або методу, який може включати використання ферментів, детергентів або інших реагентів для розщеплення клітин і вивільнення ДНК. Виділену ДНК потім кількісно визначають і оцінюють на предмет якості.

Далі гени HLA специфічно ампліфікуються за допомогою ПЛР - методу, який дозволяє селективно ампліфікувати певну ділянку ДНК. Праймери для ПЛР призначені для націлювання на гени HLA, що становлять інтерес, і ампліфікації їх у мільйонах копій. ПЛР може бути виконана за допомогою різних методів, таких як послідовно-специфічні праймери (SSP), послідовно-специфічні олігонуклеотидні зонди (SSOP) або послідовно-специфічні праймери для полімеразної ланцюгової реакції (PCR-SSP).

Після ПЛР-ампліфікації продукти аналізують за допомогою методів секвенування ДНК або гібридизації. Секвенування ДНК передбачає визначення нуклеотидної послідовності ПЛР-продукту, яка може бути використана для ідентифікації специфічних алелів HLA. Методи, засновані на гібридизації, передбачають використання специфічних зондів, які зв'язуються з ампліфікованою ДНК і мітяться сигналом, що детектується, наприклад, флуоресцентними або хемілюмінесцентними молекулами. Гібридизація зондів може бути використана для визначення наявності або відсутності специфічних алелів HLA.

HLA-типування може проводитися з різним рівнем роздільної здатності, починаючи від типування з низькою роздільною здатністю і закінчуючи типуванням з високою роздільною здатністю. Типування з низькою роздільною здатністю передбачає визначення широких груп HLA, в той час як типування з високою роздільною здатністю передбачає визначення специфічних алелів HLA. Типування з високою роздільною здатністю є кращим для трансплантації органів, оскільки воно дозволяє отримати більш точну відповідність між генами HLA донора і реципієнта.

Отже, HLA-типування включає виділення ДНК зі зразка, ампліфікацію генів HLA за допомогою ПЛР і виявлення алелів HLA за допомогою методів секвенування або гібридизації.

HLA-A\*02:01 - це конкретний алель гена лейкоцитарного антигену людини класу I (HLA-A), який широко використовується в наукових дослідженнях і клінічних застосуваннях, включаючи фарбування декстрамером. Існує кілька причин вибору саме HLA-A\*02:01 для експериментів з використанням фарбування МНС-декстрамерів:

1. Висока популяційна частота: HLA-A\*02:01 є одним з найпоширеніших алелів HLA в багатьох популяціях, що підвищує ймовірність виявлення осіб, які експресують цей алель. Ця висока популяційна частота збільшує шанси на успішну ідентифікацію та вивчення антиген-специфічних Т-клітин.

2. Широкий спектр зв'язування пептидів: HLA-A\*02:01 має широкий діапазон зв'язування пептидних антигенів, отриманих від різних патогенів або самоантигенів. Ця універсальність дозволяє виявляти та характеризувати антиген-специфічні Т-клітини, націлені на різні епітопи.

3. Добре охарактеризовані реагенти: HLA-A\*02:01 був широко вивчений, і існує велика кількість знань і комерційно доступних реагентів, спеціально розроблених для цього алеля. Сюди входять МНС-декстрамери, навантажені пептидними антигенами, які можна використовувати для виявлення та ізоляції антиген-специфічних Т-клітин.

4. Клінічне значення: HLA-A\*02:01 асоціюється з презентацією багатьох вірусних та пухлинних антигенів. Вивчення відповідей Т-клітин, специфічних до епітопів, обмежених HLA-A\*02:01, може дати цінну інформацію про імунну відповідь на інфекції, такі як ВІЛ, грип або SARS-CoV-2, а також на різні види раку.

5. Сумісність з експериментальними платформами: HLA-A\*02:01 сумісний з декількома експериментальними платформами, включаючи проточну цитофлуориметрію та технології для сортування клітин, що дозволяє ефективно виявляти та ізолювати HLA-A\*02:01-обмежені антиген-специфічні Т-клітини.

Ці фактори роблять його придатним алелем для дослідження антиген-специфічної відповіді Т-клітин у різних дослідницьких і клінічних умовах.

### 2.2.2. Ізоляція ДНК

Виділення ДНК - це процес виділення ДНК з клітин або тканин, таких як кров, слина або зразки тканин. Метою виділення ДНК є отримання чистих зразків ДНК, які можна використовувати для різних подальших досліджень, таких як ПЛР, секвенування, генотипування або клонування.

Основні етапи виділення ДНК включають лізис клітин, очищення ДНК і кількісне визначення ДНК. Під час лізису клітини руйнують, щоб вивільнити ДНК. Цього можна досягти фізичними методами, наприклад, подрібненням або ультразвуковою обробкою клітин, або хімічними методами, наприклад, додаванням до клітин миючих засобів або ферментів.

Після лізису клітин ДНК потрібно очистити від інших клітинних компонентів, таких як білки, ліпіди, РНК та інші нуклеїнові кислоти. Зазвичай для цього використовують комбінацію методів органічної екстракції та

очищення на основі колонок, які можуть вибірково зв'язувати ДНК зі смолою або мембраною, видаляючи при цьому забруднювачі.

Після очищення ДНК можна кількісно оцінити, вимірявши її поглинання при 260 нм за допомогою спектрофотометра, або за допомогою флуорометричних аналізів, які специфічно виявляють ДНК. Якість ДНК також можна оцінити, перевіривши співвідношення  $A_{260}/A_{280}$ , яке вказує на чистоту ДНК.

Виділення ДНК є критично важливим етапом НЛА-типуювання, оскільки важливо отримати високоякісну ДНК зі зразка. Якість ДНК безпосередньо впливає на точність НЛА-типуювання, тому важливо використовувати надійний та ефективний метод виділення ДНК. Одним з поширених методів виділення ДНК є використання комерційних наборів, таких як міні-набір Invitrogen PureLink Genomic DNA Mini Kit.

Набір Invitrogen PureLink Genomic DNA Mini Kit (США) забезпечує швидкий і ефективний метод виділення високоякісної геномної ДНК з різних типів зразків, включаючи цільну кров, сироватку, плазму і зразки тканин. Протокол виділення ДНК за допомогою цього набору зазвичай включає наступні етапи:

1. Лізис зразка: Зразок лізують у буфері, що містить протеїназу К і високу концентрацію солі. Цей буфер призначений для руйнування клітинної мембрани і денатурації білків, вивільняючи ДНК в розчин.

2. Зв'язування: Лізат додають у центрифужну колонку, що містить мембрану на основі кремнезему. ДНК зв'язується з мембраною, в той час як інші домішки видаляються на наступних етапах промивання.

3. Промивання: Мембрану промивають серією буферів, щоб видалити будь-які домішки, що залишилися, і забезпечити високу чистоту ДНК.

4. Виділення: Очищену ДНК екстрагують з мембрани за допомогою низькосольового елюючого буфера, в результаті чого отримують високу концентрацію ДНК, придатну для подальшого застосування.

Загалом, міні-набір Invitrogen PureLink Genomic DNA забезпечує надійний та ефективний метод виділення ДНК для HLA-типуювання. Використання комерційних наборів допомагає забезпечити високу якість ДНК і знижує ризик забруднення або деградації зразка, що призводить до більш точних результатів HLA-типуювання.

### **2.2.3. Проточно-цитофлуориметричний аналіз**

Проточна цитофлуориметрія - це потужний метод, який використовується для аналізу та сортування клітин на основі їх фізичних та хімічних характеристик. Основний принцип роботи проточної цитофлуориметрії включає наступні етапи:

1. Підготовка зразка: Першим кроком є підготовка зразка, який нас цікавить. Клітини виділяють з біологічного матеріалу і мітять флуоресцентними барвниками або антитілами, які націлені на специфічні молекули на поверхні або всередині клітини.

2. Введення зразка: Мічені клітини поміщають в проточний цитофлуориметр, який може вмістити рідку суспензію клітин.

3. Гідродинамічне фокусування: Клітини в зразку проходять через вузьке сопло під тиском, де вони гідродинамічно фокусуються в однофазний потік. Це гарантує, що тільки одна клітина за раз висвітлюється і виявляється приладом.

4. Лазерне освітлення: Клітини в однофазному потоці освітлюються лазерним променем, який змушує флуоресцентні барвники або антитіла випромінювати світло з певною довжиною хвилі.

5. Виявлення: Випромінюване світло реєструється фотоелектронними мультиплікаторами (PMT), чутливими до різних довжин хвиль світла. Кожен

РМТ вимірює кількість світла, випромінюваного на певній довжині хвилі, надаючи інформацію про флуоресценцію мічених клітин.

6. Аналіз даних: Дані, зібрані з РМТ, аналізуються за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення. Програмне забезпечення може ідентифікувати та кількісно оцінити різні популяції клітин на основі їхніх флуоресцентних властивостей, розміру та форми.

Загалом, проточна цитометрія - це універсальний метод, який може надати інформацію про різноманітні характеристики клітин, включаючи поверхневі маркери, внутрішньоклітинні молекули та стан клітинного циклу.

Cytek Aurora (США) – це проточний цитофлуориметр, який використовує технологію спектральної проточної цитометрії. Це означає, що він використовує набір спеціалізованих детекторів для захоплення повного спектру випромінювання флуоресцентних міток, а не лише декількох дискретних каналів. Це дозволяє виявляти більшу кількість флуоресцентних зондів одночасно, покращуючи здатність розпізнавати популяції клітин і зменшуючи потребу в компенсації.

Cytek Aurora має систему спектрального аналізу з високою роздільною здатністю, яка дозволяє виявляти до 40 флуоресцентних параметрів. Це особливо корисно для фарбування МНС-декстрамерів, яке зазвичай передбачає використання декількох флуорофорів для мічення різних маркерів клітинної поверхні. Також, Cytek Aurora має велику ємність для зразків, з можливістю аналізувати до 384 зразків за один цикл. Це корисно для великомасштабних експериментів і може підвищити ефективність експериментів по фарбуванню МНС-декстрамерами.

### 2.2.4. Сортування популяцій клітин

BD FACS Aria (США) – це високошвидкісний клітинний сортер, який використовується в проточній цитофлуориметрії. Він працює за допомогою лазера для виявлення і сортування окремих клітин на основі їх оптичних і флуоресцентних властивостей.

Нижче наведено покроковий огляд роботи BD FACS Aria:

1. Підготовка зразка: Зразок для сортування, як правило, суспензія клітин, готується шляхом додавання флуоресцентних барвників або антитіл для мічення певних клітинних популяцій. Потім зразок завантажується в прилад.

2. Середовище дослідження: Потік рідини, як правило, розчину, використовується для фокусування зразка у вузький потік, що швидко рухається.

3. Лазерне виявлення: Лазерний промінь використовується для освітлення кожної клітини, коли вона проходить через потік рідини-оболонки. Лазер збуджує флуоресцентні барвники або антитіла на поверхні клітини, змушуючи їх випромінювати світло з певною довжиною хвилі.

4. Оптичні та флуоресцентні властивості: Випромінюване світло потім фіксується серією детекторів, які вимірюють оптичні та флуоресцентні властивості кожної клітини. Ці властивості включають розмір, форму, зернистість і наявність або відсутність специфічних флуоресцентних маркерів.

5. Сортування: На основі виміряних властивостей, описаних вище, комп'ютерна програма визначає, які клітини сортувати і де їх сортувати. Відсортовані клітини потім відхиляються від основного потоку в пробірку або планшет за допомогою електричного заряду або механічного пристрою.

6. Аналіз після сортування: Відсортовані клітини можуть бути проаналізовані далі за допомогою різних методів, таких як мікроскопія, аналіз експресії генів або функціональні аналізи.

Загалом, клітинний сортер BD FACS Aria є потужним інструментом для сортування певних популяцій клітин на основі їх забарвлення MHC-декстрамером, який можна використовувати для подальших застосувань, таких як функціональні аналізи або секвенування одноклітинних зразків.

### **2.2.5. Статистичні методи аналізу**

Результати роботи були за допомогою програмного забезпечення FlowJo 10.8.0. Для порівняння груп, що містили параметричні показники, використовували програму Prism 8.0.1.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

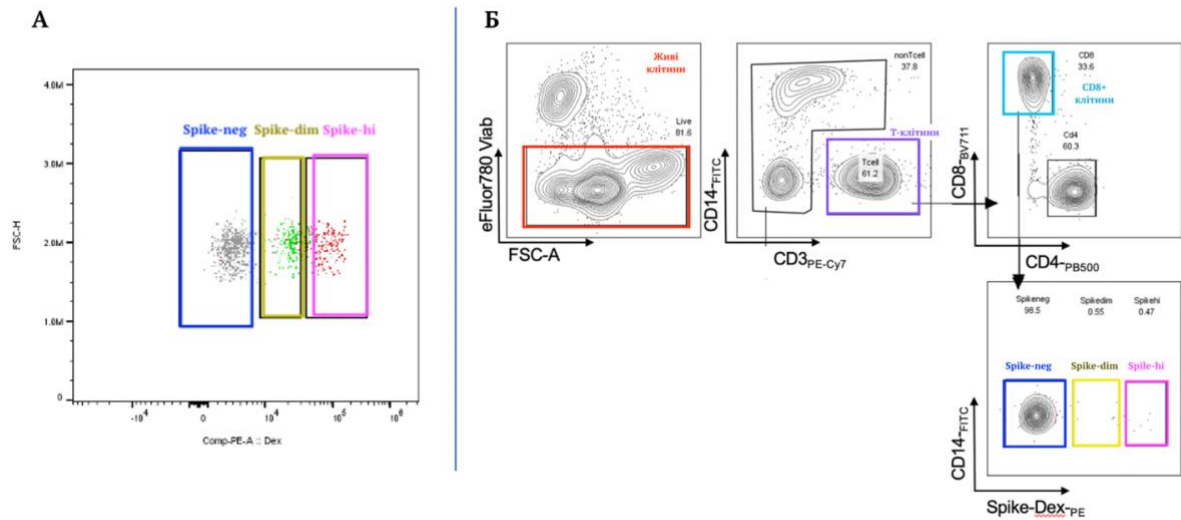
#### 3.1. Аналіз популяції антиген-специфічних CD8 Т-клітин та їх активація

Проаналізували РВМС осіб, що є носіями алелів HLA-A\*02:01 за допомогою спектральної проточної цитофлуориметрії, щоб охарактеризувати та кількісно оцінити концентрацію Spike-позитивних CD8 Т-клітин (рис. 3.1. А-В).

Три підмножини клітин, які отримали за допомогою клітинного сортера, містять популяцію з антиген-специфічними CD8<sup>+</sup> Spike-позитивними Т-клітинами, а також дві інші Spike-негативну та Spike-dim популяції, які були відсортовані на основі експресії ними білка Spike вірусу SARS-CoV-2 і, на які ми опираємось в ході дослідження. (Рис. 3.1. А ).

Ці клітини були відсортовані за допомогою клітинного сортера BD FACS Aria і фарбувалися декстрамерним МНС-мультимером для активації клітин і їх ідентифікації та аналізу. Можна стверджувати, що популяції справді «чисті», без фонових сигналів, через використання клітинного сортера та правильній стратегії з виключення небажаних та невідповідних клітинних сигналів (Рис. 3.1. Б).

Після того, як антиген-специфічні CD8<sup>+</sup> Spike-позитивні Т-клітини були відсортовані та активовані за допомогою МНС-мультимера, їх можна проаналізувати за допомогою проточної цитофлуориметрії для визначення різних властивостей, таких як їх частота (частка від загальної популяції), фенотип і функція. Цей аналіз може надати важливу інформацію про імунну відповідь проти вірусу або інших патогенів і допомогти в розробці вакцин або імунотерапії.

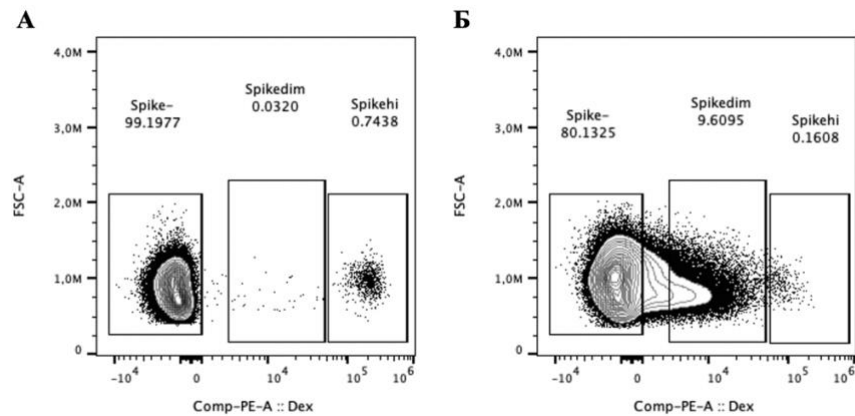


**Рис. 3.1.** Популяція досліджуваних антиген-специфічних Т-клітин: А) Відсортовані субпопуляції CD8 Т-клітин: Spike-neg, Spike-dim, Spike-hi за допомогою клітинного сортера Б) Стратегії для виключення небажаних та невідповідних клітинних сигналів

На рисунку 3.2. представлені графіки, що відображають фарбування, здійснене на несортованих PBMCs. Без рестимуляції (рисунок 3.2 Б) клітини містять можливий високий фоновий сигнал і відсутність розподілу сигналу між популяціями, порівняно з клітинами на рисунку 3.2 А. Це свідчить про необхідність використання спорідненого пептидного стимулюючого комплексу (TLR-ліганди та пептид) для правильної ідентифікації досліджуваних популяцій.

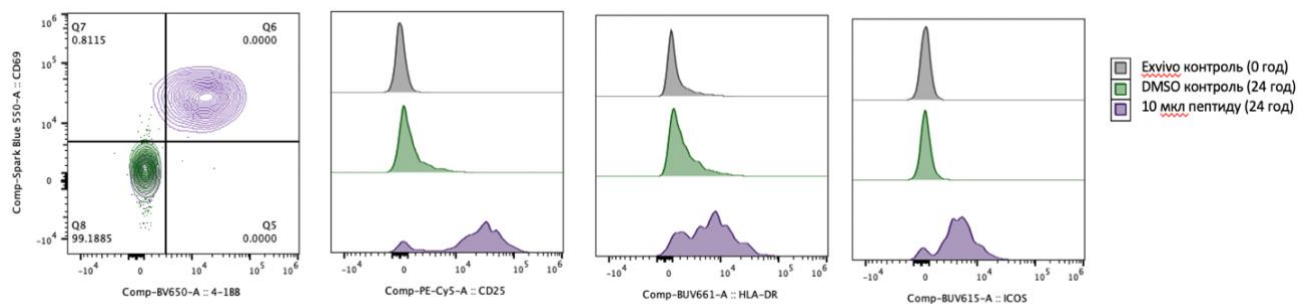
Стимуляція пептидом важлива при фарбуванні МНС-декстрамерами з кількох можливих причин. По-перше, використання рестимулюючого пептиду полегшує зв'язування, що надалі допомагає забезпечити активацію TCR на поверхні Т-клітин і збільшує доступність для зв'язування з комплексом МНС-

декстрамер. Це дає можливість спрощеного зв'язування декстрамера з TCR і підвищує чутливість забарвлення.



**Рис. 3.2.** Субпопуляції CD8 Т-клітин після повторної стимуляції А) за відсутності повторної стимуляції без використання сортеру Б)

По-друге, стимуляція пептидом, специфічним до досліджуваного антигену, гарантує, що тільки Т-клітини, специфічні до цього антигену, активуються і зв'язуються МНС-декстрамером. Це підвищує специфічність забарвлення і знижує ймовірність неспецифічного зв'язування. Останнє, стимуляція пептидом також може покращити виявлення антиген-специфічних Т-клітин, підвищуючи їх статус активації. Активовані Т-клітини експресують більш високі рівні поверхневих маркерів, таких як CD69, які можуть бути використані для ідентифікації антиген-специфічних Т-клітин.



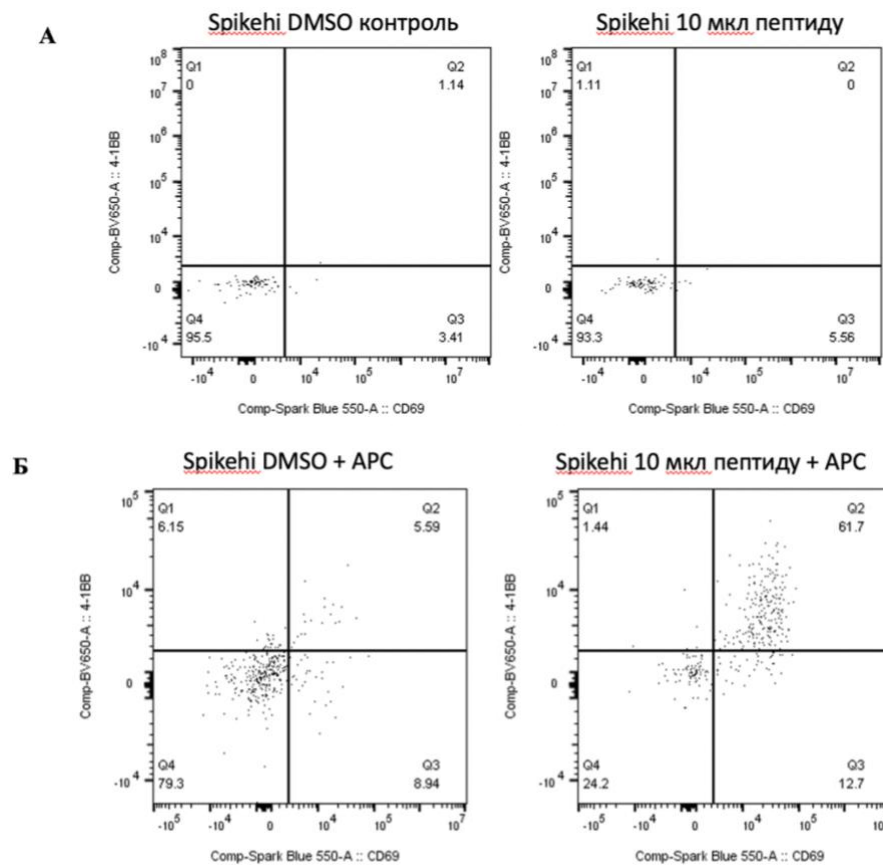
**Рис. 3.3.** Індуковані активацією CD8 Т-клітини за різної тривалості інкубації

На рисунку 3.3. представлені графіки клітин, які були активовані за допомогою МНС-мультимеру в ізольованих РВМС. Як видно з рисунку, спостерігається позитивне фарбування та активація антиген-специфічних CD8<sup>+</sup> Т-клітин. З цього можна зробити висновок, що при наявності стимулюючого пептиду у концентрації 10 мкл та тривалості фарбування 24 години, відбувається максимально висока активація антиген-специфічних CD8<sup>+</sup> Т-клітин.

Протягом 24 годин стимуляція пептидом через МНС-декстрамер дозволяє більш ефективно виявляти та активувати антиген-специфічні Т-клітини. Це можна пояснити тим, що тривала стимуляція Т-клітин антигенним пептидом дозволяє розширити специфічну популяцію Т-клітин, та в свою чергу підвищує чутливість виявлення за допомогою фарбування МНС-декстрамера. Крім того, довший час стимуляції (24 год) дозволяє Т-клітинам диференціюватися в ефекторні Т-клітини, які краще здатні розпізнавати та елімінувати специфічний антиген. В цілому, збільшення тривалості стимуляції пептидом може позитивно вплинути на чутливість та точність фарбування МНС-декстрамером при виявленні та аналізі антиген-специфічних Т-клітин.

### **3.2. Вплив присутності комплексу з CD4 Т-клітин та APC на антиген-специфічні CD8 Т-клітини**

Наступна частина нашої роботи була пов'язана з дослідженням зміни у кількісному та функціональному стані антиген-специфічних CD8<sup>+</sup> Т-клітин через присутність аутологічних відсортованих APC та CD4. Ми визначили оптимальне розведення для CD4-APC-CD8 комплексу, що становить 3:50:1.



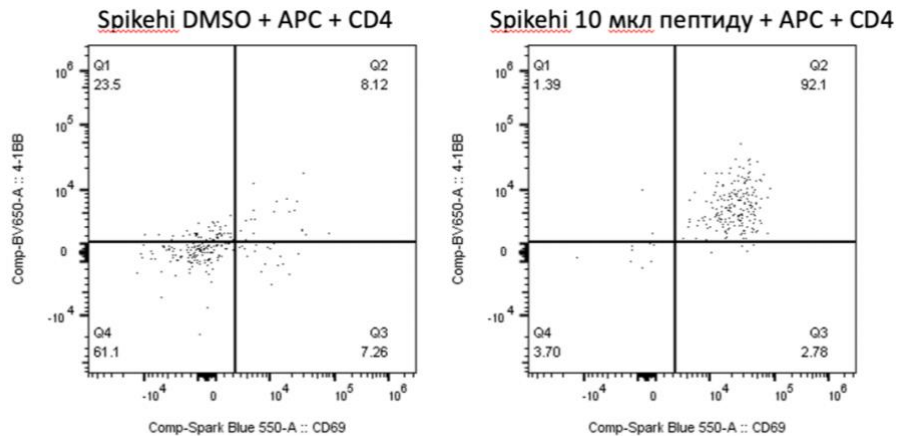
**Рис. 3.4.** Кількість індукованих активацією CD8 Т-клітин при додаванні відсортованих аутологічних APCs (Б) та при їх відсутності (А).

Представлені контроль (DMSO) та стимуляція спорідненим пептидом за однакової концентрації, а саме 10 мкл на зразок (рис. 3.4).

При відсутності APC та CD4<sup>+</sup> Т-клітин активація CD8<sup>+</sup> Т-клітин не відбувається (рис. 3.4. А), проте при додаванні аутологічних APC можна спостерігати активацію досліджуваних антиген-специфічних Spike-позитивних Т-клітин (рис. 3.4. Б).

За присутності у комплексі з APC додатково аутологічних CD4<sup>+</sup> Т-клітин відбувається антиген-специфічна активація CD8<sup>+</sup> Т-клітин (рис. 3.4. В). При порівнянні зі зразком, де присутні тільки пептид та APC – активація досягає

61.7%, в той час коли у зразка із комплексом аутологічних CD4<sup>+</sup> Т-клітин та APC – активація 92.1%.



**Рис. 3.5.** Кількість індукованих активацією CD8 Т-клітин при додаванні в оптимальному розведенні (3:50:1) комплексу відсортованих аутологічних APCs та CD4 Т-клітин

Комплекс APC-CD4 важливий для МНС-декстрамер-фарбування, оскільки він імітує природний процес імунної відповіді. В організмі APC, такі як дендритні клітини або макрофаги, представляють чужорідні антигени Т-клітинам через молекули МНС. Ця взаємодія між молекулами МНС і TCR є вирішальним етапом в ініціюванні імунної відповіді.

Під час фарбування додавання комплексу APC-CD4 допомагає забезпечити біологічну значущість взаємодії між МНС-декстрамером і TCR. Комплекс APC-CD4 діє як ко-рецептор для стабілізації зв'язування МНС-декстрамера з TCR, імітуючи природну взаємодію між молекулами МНС і Т-клітинами *in vivo*.

Без присутності комплексу APC-CD4 зв'язування МНС-декстрамера з TCR може бути недостатньо міцним або специфічним для надійного виявлення антиген-специфічних Т-клітин. Тому використання комплексу APC-CD4 при

фарбуванні МНС-декстрамером є критично важливим для точного виявлення та кількісного визначення антиген-специфічних Т-клітин.

### **3.3. Вплив інгібітора протеїнкінази на фарбування МНС-мультимером**

Важливою частиною нашого дослідження було встановити здатність інгібітора протеїнкінази (РКІ) впливати на кількісний та функціональний стан досліджуваних клітинних структур.

РКІ може впливати на процес фарбування МНС-декстрамера, пригнічуючи активацію шляхів передачі сигналу в Т-клітинах, необхідних для активації та проліферації Т-лімфоцитів. Ці інгібітори можуть блокувати активність кіназ, таких як мітоген-активовані протеїнкінази (МАРК), які беруть участь у наступних сигнальних шляхах, що активуються при залученні TCR.

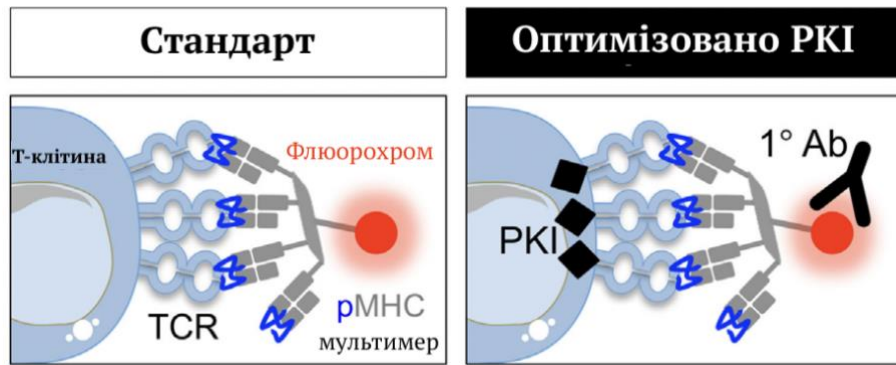
Оскільки для ідентифікації антиген-специфічних Т-клітин, які здатні розпізнавати та реагувати на певний антиген, використовується метод фарбування МНС-декстрамерів, будь-яке пригнічення активації Т-клітин може зменшити кількість клітин, здатних зв'язуватися з комплексом МНС-декстрамерів. Зокрема, додавання РКІ до Т-лімфоцитів до того, як вони будуть стимульовані антиген-специфічним пептидом, може завадити Т-лімфоцитам пройти необхідні етапи активації для зв'язування з комплексом МНС-декстрамера.

Принцип дії інгібітора протеїнкінази при фарбуванні МНС-декстрамерами для активації Т-клітин полягає в модуляції внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, необхідних для активації та проліферації Т-клітин. Протеїнкінази - це ферменти, які каталізують передачу фосфатних груп до білків, таким чином регулюючи їхню активність і функцію.

У рамках фарбування МНС-декстрамерами РКІ використовується для блокування специфічних кіназ, які беруть участь у подальших сигнальних подіях, що запускаються при взаємодії з TCR. Коли Т-клітини стикаються зі спорідненим антигеном, представленим молекулами МНС, запускається серія внутрішньоклітинних сигнальних каскадів, що призводить до активації Т-клітин і подальшої імунної відповіді. Інгібуючи специфічні протеїнкінази, інгібітор втручається у процеси фосфорилування та подальші сигнальні шляхи, які зазвичай запускаються при взаємодії з TCR. Така модуляція сигнальних шляхів може впливати на активацію, проліферацію та продукцію цитокінів Т-клітинами.

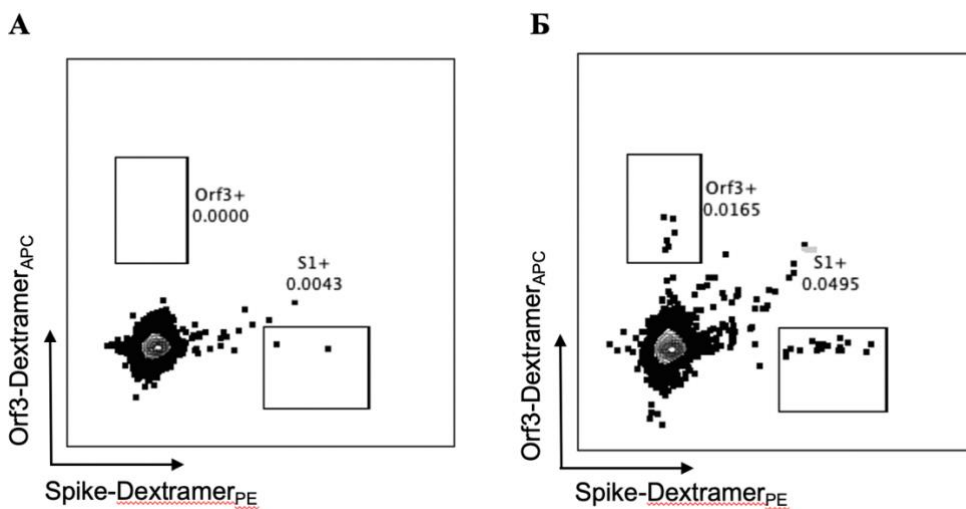
Включення РКІ під час фарбування МНС-декстрамером спрямоване на пригнічення активації Т-клітин з метою забезпечення більш контрольованого аналізу антиген-специфічних підгруп Т-клітин. Цей підхід допомагає розрізнити специфічні популяції Т-клітин на основі їх здатності зв'язуватися з комплексом МНС-декстрамер без втручання наступних сигнальних подій.

Включення антифлуорохромного антитіла (Ab) у фарбування МНС-декстрамера є важливим, оскільки воно дозволяє зшивати мультимери рМНС на поверхні Т-лімфоцитів. РКІ блокує внутрішньоклітинні сигнальні шляхи, які в іншому випадку призвели б до інтерналізації мультимерів рМНС Т-клітинами. Однак мультимери рМНС все одно можуть від'єднуватися від поверхні Т-лімфоцитів, особливо під час відмивання. Якщо до фарбування додати антифлуорохромні антитіла, вони зв'язуються з флуорохромом на мультимері рМНС і діють як місток між поверхнею Т-лімфоцитів і мультимером рМНС. Таке зшивання допомагає стабілізувати мультимери рМНС на поверхні Т-клітин, тим самим підвищуючи чутливість і специфічність забарвлення (рис. 3.5.).



**Рис. 3.6.** Стандартний і оптимізований підходи до фарбування для виявлення антигенспецифічних Т-клітин. Оптимізоване фарбування використовує протеїнкіназний інгібітор (РКІ)

На графіку можна спостерігати досить малий відсоток антиген-специфічних декстрамер-позитивних клітин (рис. 3.6.[46]). Було встановлено, що відсоток антиген-специфічних декстрамер-позитивних клітин збільшився при використанні оптимізованого протоколу порівняно зі стандартним підходом та популяції стали більш помітними. З цього випливає, що включення РКІ, для створення оптимального протоколу фарбування МНС-мультимерів дозволяє відносно краще виявити досліджуванні клітини.



**Рис. 3.7.** Вплив присутності РКІ на кількісний та функціональний стан досліджуваних клітинних структур: А) РКІ відсутній Б) РКІ присутній.

Загалом, РКІ діє як інструмент для модуляції активації та сигналізації Т-клітин, що дозволяє проводити більш контрольований аналіз антиген-специфічних відповідей Т-клітин під час фарбування МНС-декстрамерами.

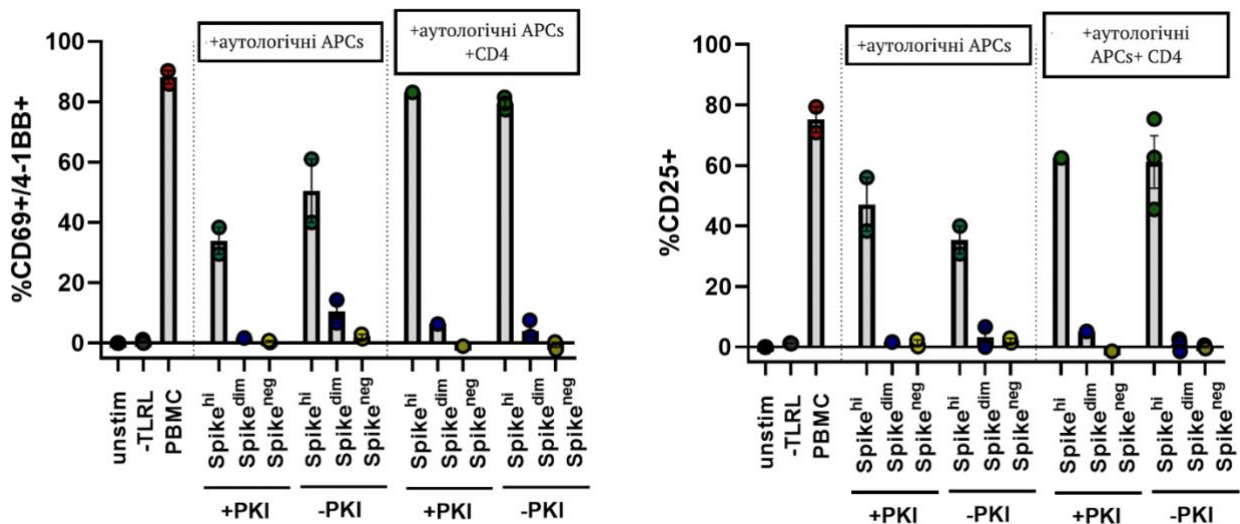
### **3.4. Оптимізація методу виявлення антиген-специфічних CD8 Т-клітин за допомогою методу пептидної рестимуляції**

Відповідно до мети даної кваліфікаційної роботи були визначені найефективніші умови стимуляції клітин, що найкраще підходять для створення стандартизованого підходу виявлення антиген-специфічних CD8 Т-клітин. Для перевірки специфічності методу наведено два графіки (рис. 3.7.) з різними маркерами активації (CD25 та CD69).

CD25 (альфа-ланцюг рецептора інтерлейкіну-2) і CD69 (антиген ранньої активації) - це поверхневі маркери клітин, які відіграють важливу роль в активації CD8 Т-клітин.

CD25 – це маркер, який підвищується при активації Т-клітин. Експресія CD25 індукується залученням TCR та костимулюючими сигналами, а його регуляція вважається маркером ранньої активації Т-клітин. Щойно CD25 експресується на поверхні Т-лімфоцитів, він дозволяє їм зв'язуватися з інтерлейкіном-2 (IL-2), цитокіном, що виробляється активованими Т-лімфоцитами та іншими імунними клітинами, і реагувати на нього. Зв'язування IL-2 з рецептором IL-2R $\alpha$ /CD25 запускає сигнальний каскад, який призводить до проліферації та диференціації Т-клітин в ефекторні Т-клітини та Т-клітини пам'яті. Зв'язування IL-2 з CD25 запускає сигнальні шляхи, які сприяють проліферації та диференціації Т-клітин, що сприяє збільшенню кількості антиген-специфічних Т-клітин CD8 під час імунної відповіді.

CD69 – маркер ранньої активації, який швидко експресується на поверхні Т-клітин після активації. Він бере участь у регуляції імунної відповіді та індукується TCR-сигналом та іншими сигналами активації. CD69 відіграє важливу роль у навігації Т-клітин до запалених тканин і модуляції порогів активації Т-клітин. Його експресія пов'язана з активацією Т-клітин та ефektorними функціями. Експресія CD69 на Т-клітинах CD8 є тимчасовою, досягаючи піку незабаром після активації, а потім знижується з часом.



**Рис. 3.8.** Оцінка різних умов фарбування для створення стандартизованого аналізу щодо визначення чутливості виявлення антиген-специфічних Т-клітин.

Аналізуючи дані зображені (див. рис. 3.7.), ми спостерігаємо дуже низьку кількість активованих антиген-специфічних CD8 клітин та високий показник активації в несортованих цільних РВМС. Це свідчить про наявність гетерогенної популяції клітин у РВМС, яка включає як активовані, так і неактивовані клітини. Хоча сортування РВМС може розділити клітини на основі поверхневих маркерів, це не завжди призводить до активації всіх Т-лімфоцитів. Оптимізація методу необхідна для покращення цих результатів.

При фарбуванні МНС-декстрамерами використання стимулюючих пептидів та РКІ має важливе значення для активації Т-клітин та індукції відповіді. Без цих стимулів Т-лімфоцити можуть бути не повністю активовані, що може призвести до зниження рівня забарвлення МНС-декстрамера. Крім того, рівень активації може змінюватися залежно від антигенної специфічності Т-клітин, присутніх у популяції РВМС. Деякі антиген-специфічні Т-клітини можуть бути більш чутливими до конкретного антигену, що призводить до різних рівнів активації та фарбування МНС-декстрамера.

Включення у протокол РКІ, для створення оптимального протоколу фарбування МНС мультимерів дозволяє збільшити кількість виявлених антиген-специфічних CD8 клітин. Додаткова наявність CD4+APC у комплексі з антиген-специфічними CD8 клітинами сприяє більш однорідній та антиген-специфічній активації досліджуваних CD8 Spike-позитивних клітин, що є специфічними до антигену вірусу.

Використання оптимізованого протоколу фарбування МНС-декстрамера, який включає використання РКІ, комплексу CD4-APC, стимулюючого пептиду і 24-годинного періоду інкубації, дозволяє ефективно активувати антиген-специфічні Т-клітини. Це гарантує, що Т-клітини стимулюються і здатні зв'язуватися з МНС-декстрамером, що дозволяє точно виявляти і кількісно оцінювати антиген-специфічні Т-клітини.

З іншого боку, відсутність оптимізації протоколу фарбування МНС-декстрамера може призвести до хибнонегативних результатів або неточного кількісного визначення антиген-специфічних Т-клітин. Наприклад, без використання РКІ Т-клітини можуть бути не повністю активовані і не можуть ефективно зв'язуватися з МНС-декстрамером, що призводить до зниження інтенсивності сигналу і потенційно неправильної ідентифікації антиген-специфічних Т-клітин.

Загалом, використання оптимізованого протоколу для фарбування МНС-декстрамера має вирішальне значення для забезпечення точного і надійного

виявлення антиген-специфічних Т-клітин, що важливо для вивчення імунних реакцій і розробки імунотерапії. Важливо оптимізувати протокол, включаючи використання стимулюючих пептидів та інгібіторів протеїнкіназ, і аналізувати результати з ретельним урахуванням специфічних популяцій Т-клітин, присутніх у зразку.

Метод оптимізації фарбування МНС-декстрамера для активації Spike-специфічних Т-клітин у пацієнтів з COVID-19 може мати важливі наслідки для розробки ефективних вакцин та методів лікування. Імунна система реагує на спайковий білок SARS-CoV-2, а Т-клітини, які виявляють і реагують на цей білок, можуть мати вирішальне значення у формуванні захисної імунної відповіді.

Завдяки оптимізації фарбування МНС-декстрамера, ми зможемо точно визначити та оцінити кількість Spike-специфічних Т-клітин у пацієнтів з COVID-19. Це може мати кілька практичних застосувань:

1. Розробка вакцин: Розуміння імунної відповіді на спайковий білок може допомогти у розробці ефективних вакцин, які стимулюють сильну відповідь Т-клітин.

2. Розробка терапії: Виявлення та ізоляція Spike-специфічних Т-клітин у пацієнтів, які одужали від COVID-19, може потенційно забезпечити пул Т-клітин для клітинної терапії.

3. Моніторинг захворювання: Відстеження рівнів Spike-специфічних Т-клітин у пацієнтів з COVID-19 під час та після інфікування може дати уявлення про ефективність імунної відповіді та допомогти в лікуванні захворювання.

Підсумовуючи, можна сказати, що оптимізація фарбування МНС-декстрамерами для активації Spike-специфічних Т-клітин може надати цінну інформацію для розробки ефективних вакцин, терапії та стратегій контролю перебігу захворювання у пацієнтів, хворих на COVID-19.

## ВИСНОВКИ

1. Оптимізовано підхід для виявлення антиген-специфічних CD8 T-клітин. Підтверджено специфічність фарбування та високу частку активації досліджуваної антиген-специфічної популяції клітин методом пептидної рестимуляції.
2. Виявлено, що кількість антиген-специфічних T-клітин залежить від повторної стимуляції з використанням пептидного стимулюючого комплексу (TLR ліганди та пептид). За наявності стимулюючого пептиду у концентрації 10 мкг та фарбування тривалістю 24 год, відмічено максимально високу активацію антиген-специфічної CD8+ популяції.
3. Зафіксовано виражене збільшення кількості антиген-специфічних T-клітин після присутності у комплексі із антиген-специфічними CD8 клітинами також CD4-клітин та APC у співвідношенні CD4:APC:CD8 = 3:50:1. Це свідчить про позитивний вплив, що спричинює однорідну та антиген-специфічну активацію досліджуваних клітин.
4. Встановлено, що присутність інгібітора протеїнкінази (PKI) впливає на кількість та функціональний стан CD8 T-клітин. Після оптимізації протоколу з PKI зафіксовано статистично достовірне збільшення рівня активованих клітин і дозволило покращити виявлення популяцій.
5. Оптимізація протоколу для панелей з низкою різних пептидів та епітопів є важливим етапом у подальшому секвенуванні scRNA для відстеження фенотипового і клонального розвитку під час гострої форми COVID-19.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Farber DL, Netea MG, Radbruch A, Rajewsky K, Zinkernagel RM. Immunological memory: lessons from the past and a look to the future. *Nature Reviews Immunology* 2016 16:2 2016; 16: 124–128.
2. Aiba Y, Kometani K, Hamadate M *et al.* Preferential localization of IgG memory B cells adjacent to contracted germinal centers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 12192–12197.
3. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* 2018; 14: 1–10.
4. Netea MG, Schlitzer A, Placek K, Joosten LAB, Schultze JL. Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. *Cell Host Microbe* 2019; 25: 13–26.
5. Kaur BP, Secord E. Innate Immunity. *Immunol Allergy Clin North Am* 2021; 41: 535–541.
6. Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. <https://doi.org/101146/annurev-immunol-032414-112240> 2015; 33: 257–290.
7. McComb S, Thiriot A, Akache B, Krishnan L, Stark F. Introduction to the Immune System. *Methods in Molecular Biology* 2019; 2024: 1–24.
8. Netea MG, Balkwill F, Chonchol M *et al.* A guiding map for inflammation. *Nature Immunology* 2017 18:8 2017; 18: 826–831.
9. Mueller SN, Mackay LK. Tissue-resident memory T cells: local specialists in immune defence. *Nature Reviews Immunology* 2015 16:2 2015; 16: 79–89.
10. La Gruta NL, Turner SJ. T cell mediated immunity to influenza: mechanisms of viral control. *Trends Immunol* 2014; 35: 396–402.

11. Laidlaw BJ, Craft JE, Kaech SM. The multifaceted role of CD4<sup>+</sup> T cells in CD8<sup>+</sup> T cell memory. *Nature Reviews Immunology* 2016 16:2 2016; 16: 102–111.
12. van Gisbergen KPJM, Zens KD, Münz C. T-cell memory in tissues. *Eur J Immunol* 2021; 51: 1310–1324.
13. van Gisbergen KPJM, Zens KD, Münz C. T-cell memory in tissues. *Eur J Immunol* 2021; 51: 1310–1324.
14. Kaech SM, Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8<sup>+</sup> T cell differentiation. *Nature Reviews Immunology* 2012 12:11 2012; 12: 749–761.
15. Krueger PD, Osum KC, Jenkins MK. CD4<sup>+</sup> Memory T-Cell Formation during Type 1 Immune Responses. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2021; 13.
16. Raphael I, Joern RR, Forsthuber TG. Memory CD4<sup>+</sup> T Cells in Immunity and Autoimmune Diseases. *Cells* 2020, Vol 9, Page 531 2020; 9: 531.
17. Hervas-Stubbs S, Olivier A, Boisgerault F, Thieblemont N, Leclerc C. TLR3 ligand stimulates fully functional memory CD8<sup>+</sup> T cells in the absence of CD4<sup>+</sup> T-cell help. *Blood* 2007; 109: 5318–5326.
18. Wu T, Hu Y, Lee Y-T *et al.* Lung-resident memory CD8 T cells (TRM) are indispensable for optimal cross-protection against pulmonary virus infection. *J Leukoc Biol* 2014; 95: 215.
19. Kumamoto Y, Mattei LM, Sellers S, Payne GW, Iwasaki A. CD4<sup>+</sup> T cells support cytotoxic T lymphocyte priming by controlling lymph node input. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 8749–8754.
20. Sokke Umeshappa C, Hebbandi Nanjundappa R, Xie Y *et al.* CD154 and IL-2 Signaling of CD4<sup>+</sup> T Cells Play a Critical Role in Multiple Phases of CD8<sup>+</sup> CTL Responses Following Adenovirus Vaccination. *PLoS One* 2012; 7: 47004.

21. Sckisel GD, Bouchlaka MN, Monjazez AM *et al.* Out-of-Sequence Signal 3 Paralyzes Primary CD4<sup>+</sup> T-Cell-Dependent Immunity. *Immunity* 2015; 43: 240–250.
22. Kimura MY, Pobeziński LA, Guinter TI *et al.* IL-7 signaling must be intermittent, not continuous, during CD8<sup>+</sup> T cell homeostasis to promote cell survival instead of cell death. *Nature Immunology* 2012 14:2 2012; 14: 143–151.
23. Huang G, Wang Y, Vogel P, Kanneganti TD, Otsu K, Chi H. Signaling via the kinase p38 $\alpha$  programs dendritic cells to drive TH17 differentiation and autoimmune inflammation. *Nature Immunology* 2012 13:2 2012; 13: 152–161.
24. Segura E, Touzot M, Bohineust A *et al.* Human Inflammatory Dendritic Cells Induce Th17 Cell Differentiation. *Immunity* 2013; 38: 336–348.
25. Lee KH, Holdorf AD, Dustin ML, Chan AC, Allen PM, Shaw AS. T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science* (1979) 2002; 295: 1539–1542.
26. Tseng S-Y, Waite JC, Liu M, Vardhana S, Dustin ML. T Cell-Dendritic Cell Immunological Synapses Contain TCR-dependent CD28-CD80 Clusters That Recruit Protein Kinase C $\theta$ . *The Journal of Immunology* 2008; 181: 4852–4863.
27. Notley CA, McCann FE, Inglis JJ, Williams RO. Anti-CD3 therapy expands the numbers of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> Treg cells and induces sustained amelioration of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 171–178.
28. Tai Y, Wang Q, Korner H, Zhang L, Wei W. Molecular mechanisms of T cells activation by dendritic cells in autoimmune diseases. *Front Pharmacol* 2018; 9: 642.
29. Lee SW, Park Y, So T *et al.* Identification of regulatory functions for 4-1BB and 4-1BBL in myelopoiesis and the development of dendritic cells. *Nature Immunology* 2008 9:8 2008; 9: 917–926.

30. Elpek KG, Yolcu ES, Franke DDH, Lacelle C, Schabowsky R-H, Shirwan H. Ex Vivo Expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T Regulatory Cells Based on Synergy between IL-2 and 4-1BB Signaling. *The Journal of Immunology* 2007; 179: 7295–7304.
31. Hwang JR, Byeon Y, Kim D, Park SG. Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development. *Experimental & Molecular Medicine* 2020 52:5 2020; 52: 750–761.
32. Kim TS, Shin EC. The activation of bystander CD8<sup>+</sup> T cells and their roles in viral infection. *Experimental & Molecular Medicine* 2019 51:12 2019; 51: 1–9.
33. Alanio C, Nicoli F, Sultanik P *et al.* Bystander hyperactivation of preimmune CD8<sup>+</sup> T cells in chronic HCV patients. *Elife* 2015; 4.
34. Loh L, Wang Z, Sant S *et al.* Human mucosal-associated invariant T cells contribute to antiviral influenza immunity via IL-18-dependent activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113: 10133–10138.
35. Younes SA, Freeman ML, Mudd JC *et al.* IL-15 promotes activation and expansion of CD8<sup>+</sup> T cells in HIV-1 infection. *J Clin Invest* 2016; 126: 2745.
36. Kim TS, Shin EC. The activation of bystander CD8<sup>+</sup> T cells and their roles in viral infection. *Experimental & Molecular Medicine* 2019 51:12 2019; 51: 1–9.
37. Mason RJ. Pathogenesis of COVID-19 from a cell biologic perspective. *Eur Respir J* 2020; 55.
38. Moss P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nature Immunology* 2022 23:2 2022; 23: 186–193.
39. Guo YR, Cao QD, Hong ZS *et al.* The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak- A n update on the status. *Mil Med Res* 2020; 7: 1–10.

40. Mousavizadeh L, Ghasemi S. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 2021; 54: 159–163.
41. Wu C, Liu Y, Yang Y *et al.* Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharm Sin B* 2020; 10: 766–788.
42. Rogers NC, Slack EC, Edwards AD *et al.* Syk-dependent cytokine induction by dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* 2005; 22: 507–517.
43. Koop A, Lepenies I, Braum O *et al.* Novel splice variants of human IKK $\epsilon$  negatively regulate IKK $\epsilon$ -induced IRF3 and NF- $\kappa$ B activation. *Eur J Immunol* 2011; 41: 224–234.
44. Hosseini A, Hashemi V, Shomali N *et al.* Innate and adaptive immune responses against coronavirus. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2020; 132: 110859.
45. Adamo S, Michler J, Zurbuchen Y *et al.* Signature of long-lived memory CD8<sup>+</sup> T cells in acute SARS-CoV-2 infection. *Nature* 2021 602:7895 2021; 602: 148–155.
46. Dolton G, Zervoudi E, Rius C *et al.* Optimized peptide-MHC multimer protocols for detection and isolation of autoimmune T-cells. *Front Immunol* 2018; 9: 1378.
47. Maguire O, Chen GL, Hahn TE *et al.* Quantifying MHC dextramer-induced NFAT activation in antigen-specific T cells as a functional response parameter. *Methods* 2017; 112: 75–83.