

МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

УДК 612.018

Е. М. Куклина, И. В. Некрасова, Ю. В. Валиева

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

СЕМАФОРИН SEMA4D В РЕГУЛЯЦИИ TFH-ПОДОБНЫХ КЛЕТОК

Изучена роль эндогенного семафорина Sema4D в контроле активности циркулирующих фолликулярных Т-хелперных клеток (CD4⁺CXCR5⁺Т-лимфоцитов). Показано участие Sema4D в экспрессии этими клетками функциональной молекулы PD-1, а также в Т-зависимой дифференцировке В-лимфоцитов в совместной Т-/В-клеточной культуре в ответ на поликлональную активацию Т-лимфоцитов. Представленные данные демонстрируют новый потенциальный механизм Sema4D-зависимой регуляции гуморального иммунного ответа, связанный с непосредственным участием семафорина в дифференцировке В-лимфоцитов, поддерживаемой фолликулярными Т-хелперами.

Ключевые слова: Sema4D; фолликулярные Т-хелперы; дифференцировка В-лимфоцитов.

E. M. Kuklina, I. V. Nekrasova, Yu. V. Valieva

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch RAS, Perm, Russian Federation

SEMAPHORIN SEMA4D IN THE REGULATION OF TFH-LIKE CELLS

The role of endogenous semaphorin Sema4D in the control of circulating follicular T helper cells (CD4⁺CXCR5⁺T lymphocytes) has been studied. The involving of Sema4D in functional molecule PD-1 expression increasing, as well as in T-dependent B lymphocyte differentiation in T/B-coculture in response to polyclonal T lymphocyte activation was shown. The data demonstrate a possible new mechanism of Sema4D-dependent regulation of the humoral immune response, implying the direct semaphorin participation in B-lymphocyte differentiation, supported by follicular helper T cells.

Key words: Sema4D; follicular helper T cells; B lymphocyte differentiation.

Введение

Фолликулярные хелперные Т-клетки (Т follicular helper cells, Tfh) – субпопуляция CD4⁺Т-лимфоцитов, ответственная за формирование эффективного гуморального иммунного ответа, предполагающего клональную экспансию В-лимфоцитов, переключение классов иммуноглобулинов и «созревание» их аффинности к антигену [Oi, 2016]. Эти процессы протекают в зародышевых центрах вторичных лимфоидных органов и завершаются образованием плазмобластов – активно пролиферирующих и продуцирующих иммуноглобулины клеток, которые, покидая зародышевые центры, финально дифференцируются в плазматические клетки или В-клетки памяти. Маркеры Tfh тесно связаны с функциями этих клеток: хемокиновый рецептор CXCR5 нужен для хоминга Т-лимфоцитов в В-клеточные фолликулы, а

функциональная молекула PD-1 регулирует формирование зародышевых центров, выживание В-лимфоцитов и селекцию высокоаффинных плазматических клеток, а также продукцию интерлейкина 21 (IL-21) [Good-Jacobson et al., 2010; Oi, 2016]. Циркулирующие Tfh, так называемые Tfh-подобные клетки, имеют общие черты с фолликулярными Т-хелперами зародышевых центров [Feng et al., 2011; Morita et al., 2011], поэтому анализ Tfh-подобных клеток периферической крови рассматривается как эффективный альтернативный подход к изучению их аналогов в зародышевых центрах [T follicular ..., 2015].

Семафорин Sema4D – многофункциональная молекула, играющая важную роль в процессах аксонального наведения, а также в ангиогенезе и иммунорегуляции [Zhang et al., 2013]. В иммунной системе основным источником Sema4D являются Т-лимфоциты [Kumanogoh et al., 2002]. Они экс-

прессируют семафорин на мембране и частично «сбрасывают» его в ответ на активацию [Wang et al., 2001]. При этом растворимый Sema4D сохраняет функции мембранной молекулы [Wang et al., 2001]. Основным рецептором для Sema4D в иммунной системе, CD72, экспрессируется преимущественно В-лимфоцитами и играет важную роль в ответе этих клеток на антиген [Kumanogoh et al., 2000], поэтому особый интерес вызывает роль семафорина в Т-/В-клеточных взаимодействиях. В первую очередь, это относится к Tfh-зависимой дифференцировке В-лимфоцитов. Цель настоящей работы – определить вклад эндогенного Sema4D в регуляцию активности Tfh-подобных клеток *in vitro*, в совместной Т-/В-клеточной культуре на фоне поликлональной активации Т-лимфоцитов. В частности, мы оценили экспрессию функционального маркера PD-1 Tfh-подобными клетками в культуре и эффективность Tfh-зависимой дифференцировки В-лимфоцитов на фоне блокады семафорина.

Материал и методы исследования

Мононуклеарные клетки выделяли из гепаринизированной венозной крови здоровых доноров центрифугированием в градиенте плотности фикола-верографина (1,077 г/см³). Из полученной суспензии далее выделяли Т-лимфоциты (CD4⁺-клетки) и В-лимфоциты (CD19⁺-клетки) – фракционированием на иммуномагнитных частицах, с помощью стандартных систем для выделения (“R&D Systems”). Оценку роли эндогенного Sema4D в контроле Т-зависимой В-клеточной активации проводили в совместной Т/В-клеточной культуре [T follicular ..., 2015]: фракционированные CD4⁺Т-клетки культивировали с аутологичными В-лимфоцитами в соотношении 1:1 (5×10⁴ клеток/мл) в течение 5 сут. в среде RPMI1640 (“Gibco”) с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки (“Serva”), 300 мкг/мл L-глутамин (“Serva”), 0.01M HEPES (“Sigma”) и 100 мкг/мл гентамицина (“Pharmacia”) при 37°C и 5%-ным CO₂ – без активатора и на фоне поликлональной активации Т-лимфоцитов иммобилизованными антителами к CD3/CD28 (“Invitrogen”). Уровень Tfh-подобных клеток оценивали по экспрессии CD4⁺Т-лимфоцитами хемокинового рецептора CXCR5, а их активность – по экспрессии функционального маркера PD-1 и по формированию плазмобластов (CD19⁺CD20⁺CD38⁺-клеток) в культуре [T follicular ..., 2015; Jourdan et al., 2011] – проточной цитометрией, с использованием соответствующих моноклональных антител: анти-CXCR5*PE (“R&D Systems”), анти-PD-1*FITC (“Biolegend”), анти-CD38*PE (“Biolegend”), анти-CD20*FITC (“Biolegend”), анти-CD19*PerCP (“R&D Systems”), анти-CD4*PerCP (“R&D Systems”). Участие эндогенного Sema4D в этом процессе оценивали ингиби-

торным анализом, за счет внесения в культуру рекомбинантного плексина B2 (“R&D Systems”, 5329-PB, 5 мкг/мл), эффективно связывающего Sema4D и блокирующего Sema4D-зависимый сигнал, – за 1 ч. до активации. Статистический анализ проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Процессы Т-зависимой В-клеточной активации исследовали на модели *in vitro*, предполагающей совместное культивирование Т-лимфоцитов с аутологичными В-клетками в условиях поликлональной активации Т-лимфоцитов [T follicular ..., 2015]. При этом активность Tfh-подобных клеток оценивали как косвенно, по экспрессии молекулы PD-1, участвующей в реализации функций этих клеток, так и напрямую, по дифференцировке В-лимфоцитов, индуцируемой фолликулярными Т-хелперами.

Культивирование CD4⁺Т-лимфоцитов в присутствии В-клеток не приводило к статистически значимым изменениям содержания Tfh-подобных (CD4⁺CXCR5⁺) клеток ни в спонтанном варианте, ни в случае активации, и блокада Sema4D не оказывала влияния на эти процессы (рис. 1). Анализ функциональной молекулы PD-1 выявил повышение ее экспрессии на мембране CD4⁺CXCR5⁺Т-лимфоцитов в ответ на активацию, причем на фоне блокады семафорина повышение было недостоверным (рис. 1), указывая на участие Sema4D в реализации данного эффекта.

Одновременно с экспрессией PD-1 оценивали непосредственную хелперную активность Tfh-подобных клеток, а именно – способность индуцировать дифференцировку В-лимфоцитов в плазмобласты, которая сопровождается характерными фенотипическими изменениями – появлением и последовательным усилением экспрессии на мембране гликопротеина CD38, а также утратой В-клеточного маркера CD20 [Jourdan et al., 2011].

Совместное культивирование Т-/В-лимфоцитов сопровождалось значительным увеличением количества плазмобластов (CD19⁺CD20⁺CD38⁺-клеток) в ответ на поликлональную активацию Т-лимфоцитов (рис. 2), причем на фоне блокады Sema4D этот показатель статистически значимо снижался.

Полученные данные свидетельствуют об участии Sema4D в ключевом этапе Т-зависимой дифференцировки В-лимфоцитов, формировании плазмобластов, и о том, что одним из механизмов реализации эффекта семафорина является регуляция активности Tfh-подобных клеток, в частности, повышение экспрессии этими клетками функциональной молекулы PD-1, которая защищает В-лимфоциты от апоптоза, поддерживает селекцию

высокоаффинных плазматических клеток, а также продукцию IL-21 [Good-Jacobson et al., 2010; Oi,

2016].

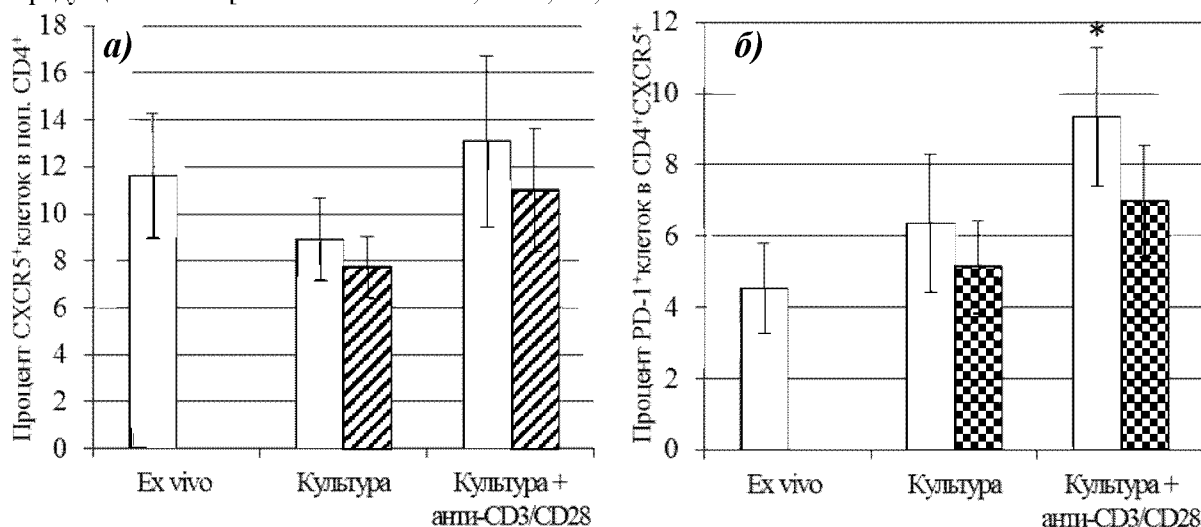


Рис. 1. Характеристика *Tfh*-подобных CD4⁺Т-лимфоцитов *ex vivo* и в совместной Т-/В-клеточной культуре на фоне поликлональной активации Т-лимфоцитов:

а) содержание CXCR5⁺-клеток в популяции CD4⁺Т-лимфоцитов; б) экспрессия PD-1 CXCR5⁺CD4⁺Т-лимфоцитами. Незаштрихованные столбцы – пробы без блокатора; заштрихованные столбцы – на фоне блокады *Sema4D*. * - $p < 0.05$ (сопоставление с соответствующим показателем без активации)

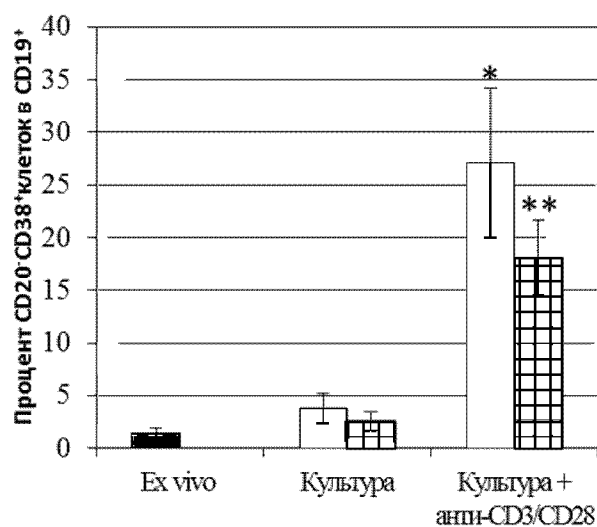


Рис. 2. Уровень плазмобластов *ex vivo* и в Т-/В-клеточной культуре.

Незаштрихованные столбцы – пробы без блокатора; заштрихованные столбцы – на фоне блокады *Sema4D*. * - $p < 0.05$ (сопоставление с соответствующим показателем без активации); ** - $p < 0.05$ (сопоставление с соответствующим показателем без блокады *Sema4D*)

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 15-04-05694.

Библиографический список

- Feng J. et al. High frequency of CD4+CXCR5+TFH cells in patients with immune-active chronic hepatitis B // PLoS One. 2011. Vol. 6, № 7. P. 1–9.
- Good-Jacobson K.L. et al. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells // Nat. Immunol. 2010. Vol. 11, № 6. P. 535–542.
- Jourdan M. et al. Characterization of a transitional preplasmablast population in the process of human B cell to plasma cell differentiation // J. Immunol. 2011. Vol. 187, № 8. P. 3931–3941.
- Kumanogoh A. et al. Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100: a novel mechanism for regulating B cell signaling // Immunity. 2000. Vol. 13, № 5. P. 621–631.
- Kumanogoh A. et al. Requirement for the lymphocyte semaphorin, CD100, in the induction of antigen-specific T cells and the maturation of dendritic cells // J. Immunol. 2002. Vol. 169, № 3. P. 1175–1181.
- Morita R. et al. Human blood CXCR5+CD4+T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion // Immunity. 2011. Vol. 34, № 1. P. 108–121.
- Oi H. T follicular helper cells in space-time // Nature. 2016. Vol. 16. P. 612–625.
- T follicular helper cells. Preface / eds. M. Espeli, M. Linterman // Methods in Molecular Biology. 2015. Vol. 1291. P. 209–226.

Wang X. et al. Functional soluble CD100/Sema4D released from activated lymphocytes: possible role in normal and pathologic immune responses // *Blood*. 2001. Vol. 97, № 11. P. 3498–3504.

Zhang Y. et al. Sema 4D/CD100-plexin B is a multifunctional counter-receptor // *Cell. Mol. Immunol.* 2013. Vol. 10, № 2. P. 97–98.

References

Espeli M., Linterman M.L. (eds.) T follicular helper cells. Preface. *Methods in Molecular Biology*. V. 1291. (2015): pp. 209–226.

Feng J., Lu L., Hua C., Qin L., Zhao P., Wang J., Wang Y., Li W., Shi X., Jiang Y. High frequency of CD4+CXCR5+TFH cells in patients with immune-active chronic hepatitis B. *PLoS One*. V. 6. N. 7 (2011): pp. 1–9.

Good-Jacobson K.L., Szumilas C.G., Chen L., Sharpe A.H., Tomayko M.M., Shlomchik M.J. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nat Immunol*. V. 11. N. 6 (2010): pp. 535–542.

Jourdan M., Caraux A., Caron G., Robert N., Fiol G., Rème T., Bolloré K., Vendrell J.P., Le Gallou S., Mourcin F., De Vos J., Kassambara A., Duperray C., Hose D., Fest T., Tarte K., Klein B. Characterization of a transitional preplasmablast population in the process of human B cell to plasma cell differentiation. *J. Immunol*. V. 187. N. 8 (2011): pp. 3931–3941.

Kumanogoh A., Suzuki K., Ch'ng E., Watanabe C., Marukawa S., Takegahara N., Ishida I., Sato T., Habu S., Yoshida K., Shi W., Kikutani H. Re-

quirement for the lymphocyte semaphorin, CD100, in the induction of antigen-specific T cells and the maturation of dendritic cells. *J. Immunol*. V. 169. N. 3 (2002): pp. 1175–1181.

Kumanogoh A., Watanabe C., Lee I., Wang X., Shi W., Araki H., Hirata H., Iwahori K., Uchida J., Yasui T., Matsumoto M., Yoshida K., Yakura H., Pan C., Parnes J.R., Kikutani H. Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100: a novel mechanism for regulating B cell signaling. *Immunity*. V. 13. N. 5 (2000): pp. 621–631.

Morita R., Schmitt N., Bentebibel S., Ranganathan R., Bourdery L., Zurawski G., Foucat E., Dullaers M., Oh S., Sabzghabaei N., Lavecchio E., Punaro M., Pascual V., Banchereau J., Ueno H. Human blood CXCR5+CD4+T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity*. V. 34. N. 1 (2011): pp. 108–121.

Oi H. T follicular helper cells in space-time. *Nature*. V. 16 (2016): pp. 612–625.

Wang X., Kumanogoh A., Watanabe C., Shi W., Yoshida K., Kikutani H. Functional soluble CD100/Sema4D released from activated lymphocytes: possible role in normal and pathologic immune responses. *Blood*. V. 97. N. 11 (2001): pp. 3498–3504.

Zhang Y., Liu B., Ma Y., Jin B. Sema 4D/CD100-plexin B is a multifunctional counter-receptor *Cell. Mol. Immunol.* 2013. V. 10. N. 2 (2013): pp. 97–98.

Поступила в редакцию 15.11.2016

Об авторах

Куклина Елена Михайловна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции
ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН
614081, Пермь, ул. Голева, 13; ibis_07@mail.ru;
(342)2808431

Некрасова Ирина Валерьевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции
ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН
614081, Пермь, ул. Голева, 13; nirina5@mail.ru

Валиева Юлия Вакифовна, аспирант
ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН
614081, Пермь, ул. Голева, 13

About the authors

Kuklina Elena Michajlovna, doctor of biology, leading researcher of laboratory immunoregulation
Institute of Ecology and Genetics of Microorganism UB RAS. 13, Golev str., Perm, Russia, 614081; ibis_07@mail.ru; (342)2808431

Nekrasova Irina Valeryevna, candidate of biology, researcher of laboratory immunoregulation
Institute of Ecology and Genetics of Microorganism UB RAS. 13, Golev str., Perm, Russia, 614081; nirina5@mail.ru

Valieva Yulia Vakifovna, post-gradual student
Institute of Ecology and Genetics of Microorganism UB RAS. 13, Golev str., Perm, Russia, 614081