

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-253

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА РАЗНООБРАЗИЯ БЕТА-ЦЕПЕЙ Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ СПЕКТРАЛЬНОЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ И BULK-RNA-TCR-СЕКВЕНИРОВАНИЯ*

QUANTIFICATION OF T-CELL RECEPTOR BETA CHAIN DIVERSITY IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS USING SPECTRAL FLOW CYTOMETRY AND BULK RNA-TCR SEQUENCING

А. Е. Егорова¹, Е. А. Астахова^{1,2}, Я. С. Киселева^{1,2}, З. Г. Антышева^{1,2},
А. А. Степанова^{1,2}, А. Д. Акино³, А. С. Головкин³, Д. В. Табаков^{1,2}, П. Ю. Волчков^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный

²Федеральный исследовательский центр инновационных

и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий, Москва

³Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург

А. Е. Egorova¹, Е. А. Astakhova^{1,2}, Y. S. Kiseleva^{1,2}, Z. G. Antysheva^{1,2}, А. А. Stepanova^{1,2},
А. D. Aquino³, А. S. Golovkin³, D. V. Tabakov^{1,2}, P. Yu. Volchkov^{1,2}

¹Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny

²Federal Research Center for Innovative and Advanced Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow

³Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg

✉ egorova.ae@genlab.llc

Аннотация

На сегодняшний день исследование репертуаров Т-лимфоцитов (TCR) и поиск клонов, ассоциированных с тем или иным заболеванием, является актуальной задачей для иммунодиагностики. В работе валидирована специфичность антител к TCR (7/10 специфичны на ~ 100 %). Также была проведена сравнительная характеристика методов анализа TCR: NGS-секвенирования, например bulk-RNA-TCR-seq, и спектральной цитометрии, выявлена слабая корреляция ($r = 0,5$).

Abstract

Today, the study of T-lymphocyte repertoires (TCR) and the search for clones associated with a particular disease is a topical task for immunodiagnosics. The work validated the specificity of antibodies to TCR (7/10 are specific by ~ 100 %). A comparative characteristic of TCR analysis methods was also carried out: NGS sequencing, for example, bulk-RNA-TCR-seq, and spectral cytometry, a weak correlation was revealed ($r = 0.5$).

В исследовании приняли участие 5 условно здоровых добровольцев, от которых были получены образцы периферической венозной крови объемом 20 мл в вакутейнерах с антикоагулянтом. Мононуклеары периферической крови (РВМС) выделяли методом центрифугирования в градиенте плотности фиколла. Образцы РВМС были окрашены антителами CD3-PerCP (клон ОКТ-3, Elabscience) и антителами к бета-цепям TCR (см. таблицу).

Панель моноклональных антител к TCR V β , используемая в исследовании

Наименование антитела TCR V β X и флуоресцентная метка	Клон антитела	IMGT наименование генов антител
V β 1-VioBlue	REA662	TRBV9, 1
V β 2-PerCP-Vio700	REA654	TRBV20, 2
V β 5.1-PE-Vio615	REA1062	TRBV5-1
V β 7.1-PE-Vio770	REA871	TRBV4, 7
V β 11-PE	REA559	TRBV25
V β 13.6-APC	REA554	TRBV6-6
V β 16-VioBrightV423	REA553	TRBV14
V β 17-VioBrightR720	REA915	TRBV17, 19
V β 21.3-FITC	REA894	TRBV11-2
V β 23-APC-Vio770	REA497	TRBV13, 23-1

* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-03-2025-662).

© А. Е. Егорова, Е. А. Астахова, Я. С. Киселева, З. Г. Антышева, А. А. Степанова, А. Д. Акино, А. С. Головкин, Д. В. Табаков, П. Ю. Волчков, 2025

Сортировку $CD3^+$ -клеток из PBMC, экспрессирующих один из TCRов, представленных в панели, проводили на спектральном проточном сортере Cytex Aurora CS. Отсортированные клетки (от 50 тыс. до 2 млн) лизировали в RLT буфере (Qiagen) и хранили при -80°C до момента выделения РНК стандартным методом с использованием TRIzol. Библиотеки нарабатывали набором MULTIPLEX RNA TCR $\alpha\beta$ KIT HUMAN (MiLaboratory). Секвенирование образцов проводили на приборе Illumina MiSeq v2. Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения MiXCR (рис. 1).

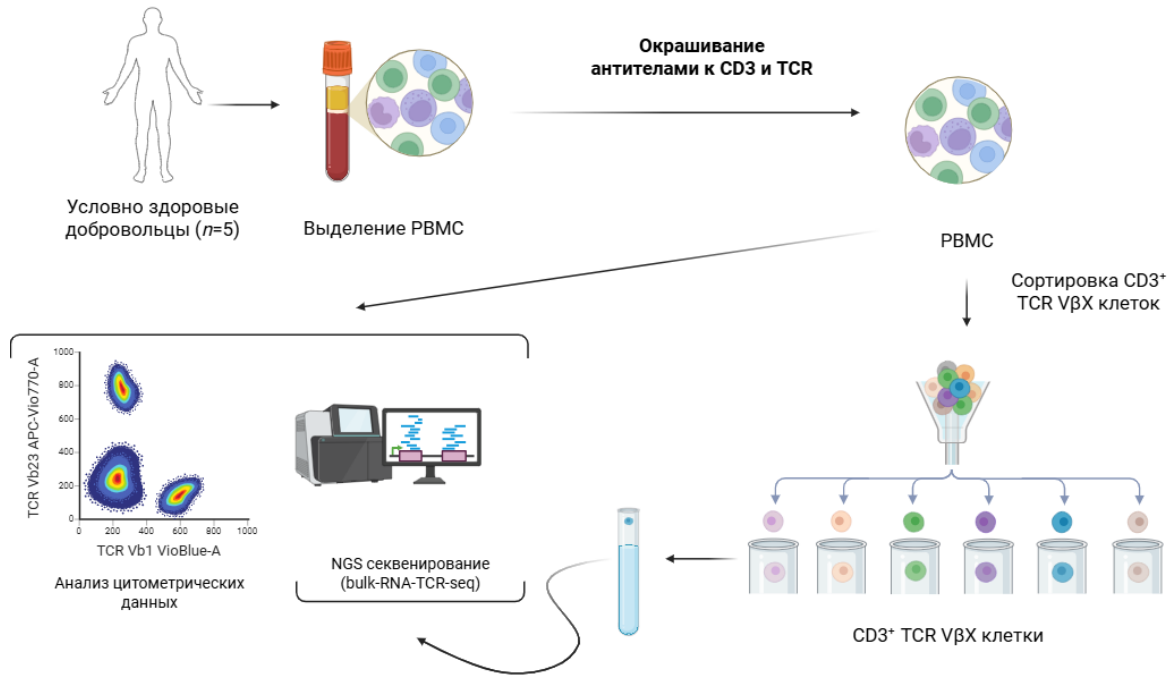


Рис. 1. Дизайн исследования

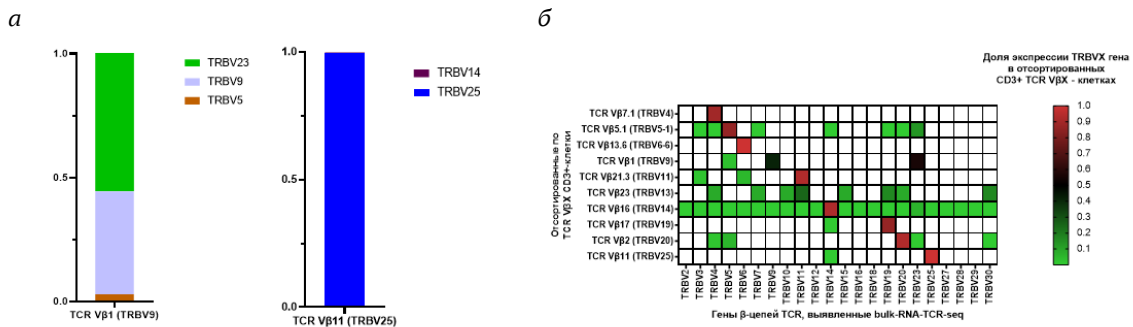


Рис. 2. Оценка специфичности антител к бета-цепям TCR: *а* — пример экспрессии TRBVX генов в отсортированных $CD3^+$ TCR $V\beta X$ -клетках; *б* — тепловая карта, показывающая долю экспрессии бета-цепей TCR в популяции $CD3^+$ -клеток, отсортированных по каждому из TCR $V\beta X$

С помощью NGS-секвенирования была оценена специфичность антител к различным бета-цепям TCR в отсортированных $CD3^+$ TCR $V\beta X$ клетках. Бета-цепи TCR соответствовали заявленным мишеням коммерческих антител к TCR $V\beta 2$, $V\beta 7.1$, $V\beta 11$, $V\beta 13.6$, $V\beta 16$, $V\beta 17$, $V\beta 21.3$ на 0,9–1 долю по уровню экспрессии, т. е. специфичность антител к этим цепям оказалась достаточно высокой (рис. 2). Антитела к $V\beta 1$, $V\beta 5.1$ оказались менее специфичными. Бета-цепь TCR, полученная из $CD3^+$ -клеток, отсортированных по TCR $V\beta 23$, не совпадала с заявленной (ген TRBV13 не экспрессировался). Ген TRBV23 является псевдогеном, однако именно его последовательности составили наибольшую долю в пуле прочтений, полученных из клеток, отсортированных по TCR $V\beta 1$, создавая ложное впечатление его высокой экспрессии. Полученный результат требует дальнейшего изучения.

На следующем этапе был проведен сравнительный анализ репертуара бета-цепей TCR в периферической крови пяти добровольцев (рис. 3). Цитометрические данные с 2 млн PBMC получали параллельно процессу сортировки. Последовательности бета-цепей из PBMC секвенировали. Для каждого добровольца был определен коэффициент корреляции Спирмена между содержанием бета-цепей в общем пуле, полученным двумя методами. Среднее значение коэффициента корреляции, рассчитанное по данным от 5 добровольцев, составило 0,5, что говорит о среднем уровне соответствия полученных результатов.

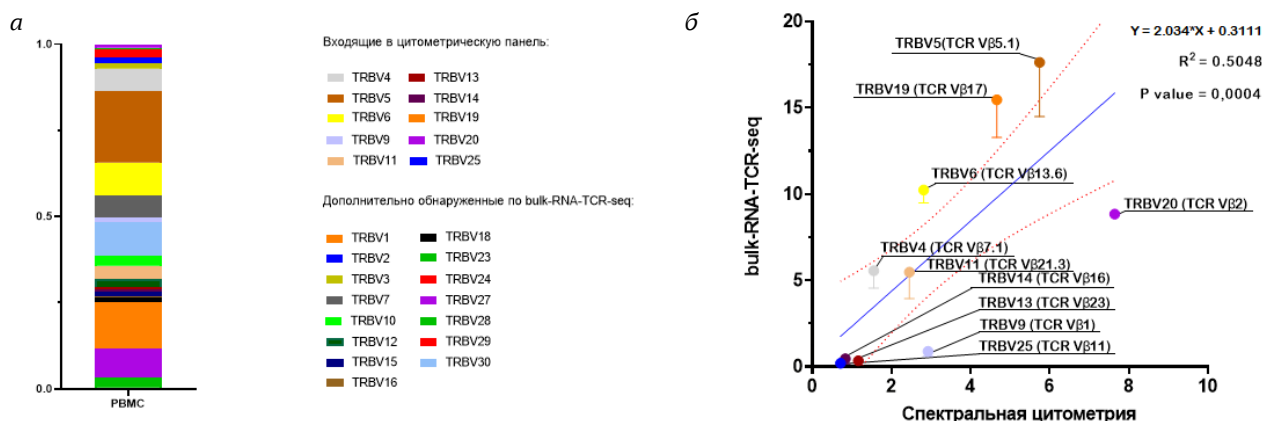


Рис. 3. Количественная оценка репертуара бета-цепей TCR в PBMC: а — пример экспрессии TRBV генов в PBMC; б — корреляция данных, полученных с помощью bulk-RNA-TCRseq и спектральной цитометрии

Таким образом, подходы по определению специфичности антител к бета-цепям TCR и полученные результаты могут быть полезны для индустрии производства моноклональных антител к сложным антигенам, а также для изучения структурных различий в бета-цепях TCR. В работе мы показали, что результаты, получаемые с помощью NGS-секвенирования и проточной цитометрии, имеют низкую корреляцию, что подчеркивает важность валидации данных секвенирования функциональными тестами.