

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ  
имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук

на правах рукописи

Егоров Евгений Станиславович

**Возрастные изменения в структуре репертуаров  
Т-клеточных рецепторов наивных Т-лимфоцитов**

Специальность – 03.01.03 – молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Научный руководитель:**

кандидат биологических наук

Британова Ольга Владимировна

**Научный консультант:**

доктор биологических наук

Чудаков Дмитрий Михайлович

Москва 2019

## Оглавление

1. Введение .....	3
2. Обзор литературы .....	5
2.1. Т-клеточные рецепторы .....	5
2.1.1. Строение и организация Т-клеточных рецепторов .....	5
2.1.2. Устройство генов Т-клеточных рецепторов .....	7
2.1.3. Созревание Т-клеток и Т-клеточных рецепторов.....	11
2.2. Старение иммунной системы .....	18
2.2.1. Инволюция тимуса .....	19
2.2.2. Поддержание Т-клеточного пула на периферии .....	21
2.2.3. Т-клеточный репертуар в старости .....	25
2.2.4. Влияние CMV на Т-клеточный репертуар.....	28
2.2.5. Функциональные изменения в старых Т-клетках.....	29
3. Цели и задачи .....	34
4. Материалы и методы.....	35
4.1. Оборудование и расходные материалы.....	35
4.2. Реактивы .....	35
4.3. Методы .....	38
4.3.1. Подбор когорт доноров и сбор образцов .....	38
4.3.2. Выделение РВМС из периферической крови .....	38
4.3.3. Окрашивание клеток моноклональными антителами .....	39
4.3.4. Флуоресцентная сортировка Т-клеток (FACS) .....	39
4.3.5. Выделение тотальной РНК.....	40
4.3.6. Синтез первой цепи кДНК.....	41
4.3.7. ПЦР-амплификация кДНК библиотек .....	43
4.3.8. Секвенирование .....	46
4.3.9. Анализ результатов секвенирования .....	46
5. Результаты и их обсуждение .....	48
5.1. Разработка качественного метода анализа иммунных репертуаров .....	48
5.1.1. Анализ репертуаров иммунных клеток на основе UMI.....	49
5.1.2. Разработка метода пробоподготовки кДНК библиотек для небольшого числа Т-клеток.....	56
5.1.3. Эффективность метода при глубоком секвенировании иммунных репертуаров .....	69
5.2. Возрастные изменения в тотальных Т-клеточных репертуарах .....	72
5.2.1. Стабильность Т-клеточного репертуара на протяжении трёх лет.....	72
5.2.2. Динамика Т-клеточного репертуара .....	74
5.3. Изменение характеристик наивных репертуаров с возрастом.....	81
5.3.1. Характеристики TCR репертуаров наивных CD4 и CD8 Т-клеток .....	81
5.3.2. Изменения характеристик в репертуарах RTE и зрелых наивных CD4 Т-клеток .....	90
5.3.3. Рост публичности репертуара наивных CD4 Т-клеток с возрастом .....	94
6. Выводы.....	97
7. Заключение.....	99
8. Список сокращений .....	100
9. Список литературы.....	102

## 1. Введение

Отличительной особенностью нашего иммунитета является способность эффективно и с высокой специфичностью распознавать инфекционные и опухолевые антигены и вырабатывать на них сбалансированный ответ. Однако с возрастом эффективность иммунитета значительно снижается, что зачастую может приводить к развитию серьезных инфекционных, аутоиммунных и онкологических заболеваний. Ключом к пониманию механизмов старения иммунитета может стать популяция наивных Т-клеток, характеризующаяся крайне разнообразным репертуаром Т-клеточных рецепторов (англ. *T-cell receptor, TCR*). Каждая Т-клетка несет на своей поверхности определенный вариант Т-клеточного рецептора, потенциально способный распознать молекулу антигена в составе главного комплекса гистосовместимости (англ. *major histocompatibility complex, MHC*) на поверхности антигенпрезентирующих клеток (англ. *antigen-presenting cell, APC*) и определяющий специфичность иммунного ответа. Таким образом, именно наивный репертуар Т-клеток в значительной степени определяет диапазон распознаваемых антигенов и эффективность иммунитета в целом.

В настоящее время технологии высокопроизводительного секвенирования (англ. *high-throughput sequencing, HTS*) нашли широкое применение в современных исследованиях адаптивного иммунитета и активно используются для глубокого анализа репертуаров Т-клеточных рецепторов. Сегодня эти технологии востребованы для изучения закономерностей функциональной организации адаптивного иммунитета в норме и патологии (аутоиммунные, онкологические, инфекционные заболевания), оценки последствий того или иного терапевтического вмешательства, затрагивающего иммунную систему (иммуносупрессия, трансплантация гемопоэтических клеток), изучения механизмов и повышения эффективности вакцинации, изучения закономерностей старения адаптивного иммунитета,

идентификации терапевтически применимых вариантов TCR, и других практических приложений.

Настоящая работа посвящена исследованию изменений в тотальных и сортированных наивных популяциях Т-клеток у доноров разного возраста. Данная работа включает три экспериментальные части. Первая часть посвящена разработке метода с применением технологии молекулярного баркодирования или уникальных молекулярных идентификаторов (англ. *unique molecular identifier, UMI*) для качественного нормированного анализа репертуаров TCR. Во второй части рассматриваются возрастные изменения в тотальных Т-клеточных репертуарах с применением разработанных методологических подходов. Третья часть посвящена анализу изменений в наивных репертуарах TCR отсортированных CD4 и CD8 Т-клеток и внутри двух субпопуляций наивных CD4: недавних эмигрантов из тимуса (англ. *recent thymic emigrant, RTE*) и зрелых наивных CD4 Т-лимфоцитов.



## 2. Обзор литературы

### 2.1. Т-клеточные рецепторы

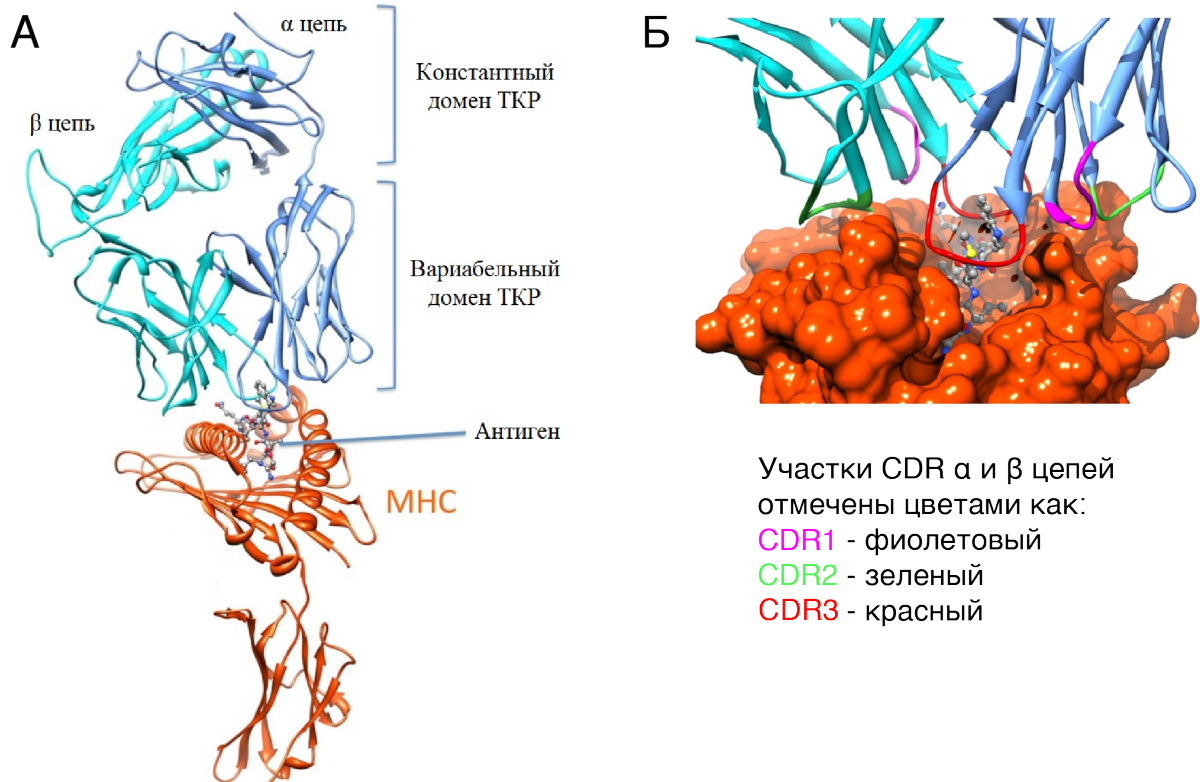
#### 2.1.1. Строение и организация Т-клеточных рецепторов

Т-клеточные рецепторы – поверхностные белковые комплексы на плазматической мембране Т-лимфоцитов, отвечающие за распознавание антигенов. В отличие от В-клеточных рецепторов (англ. *B-cell receptor, BCR*) TCR не способны непосредственно узнавать и связывать антигены. Т-клеточные рецепторы распознают антигены в виде коротких пептидных фрагментов, презентруемых на поверхности клеток в составе сложного гликопротеидного комплекса, известного как главный комплекс гистосовместимости (МНС) [1].

У человека молекулы МНС кодируются обширным кластером генов, известным как HLA (англ. *Human Leukocyte Antigen*). Молекулы главного комплекса гистосовместимости обладают высокой степенью полиморфизма – внутри одной популяции каждый тип молекулы МНС встречается во многих вариантах. Поэтому большинство людей является гетерозиготными по МНС, то есть у человека экспрессируются две различные формы каждого типа МНС молекул. Это значительно расширяет спектр пептидов, которые могут связываться с главным комплексом гистосовместимости [2]. Специфическое взаимодействие Т-клеточного рецептора с МНС и связанным с ним определенным антигеном ведет к активации Т-лимфоцита и является ключевой точкой в запуске иммунного ответа [3,4].

Закрепленный в мембране на поверхности лимфоцита Т-клеточный рецептор состоит из двух субъединиц ( $\alpha$  и  $\beta$ , либо  $\gamma$  и  $\delta$ ), связанных между собой дисульфидной связью (Рисунок 1.А). Т-лимфоциты, несущие на своей поверхности  $\alpha:\beta$  или  $\gamma:\delta$  TCR, представляют собой  $\alpha:\beta$  или  $\gamma:\delta$  Т-клетки, соответственно. По своей структуре субъединицы Т-клеточных рецепторов относятся к суперсемейству иммуноглобулинов [1]. Каждая из цепей TCR

включает в себя два домена – С-концевой, константный (C), закрепляющий рецептор в плазматической мембране Т-лимфоцита, и N-концевой, переменный (V), отвечающий за распознавание антигена.



**Рисунок 1.** (А) 3D модель TCR-pMHC комплекса. (Б) Схема взаимодействия участков CDR  $\alpha$  и  $\beta$  цепей Т-клеточного рецептора с комплексом МНС и презентруемым пептидом [5].

Взаимодействие Т-клеточного рецептора с комплексом МНС и связанным с ним антигеном осуществляется через участки, определяющие комплементарность (англ. *complementarity determining region*, CDR): три участка от  $\alpha$ -цепи и три от  $\beta$ -цепи (Рисунок 1.Б). CDR представляют собой гипервариабельные петли внутри переменных доменов Т-клеточного рецептора [5]. Именно благодаря огромному разнообразию данных участков Т-лимфоциты способны распознавать широчайший спектр различных антигенов. Исходя из разнообразия указанных переменных доменов TCR, потенциальный репертуар Т-клеточных рецепторов всей человеческой популяции по теоретическим оценкам составляет порядка  $10^{15}$  уникальных вариантов [6]. Наибольшая изменчивость TCR сосредоточена в CDR3 $\alpha$  и

CDR3 $\beta$  петлях, определяющих специфичность связывания рецептора с антигеном. Участки CDR1 и CDR2 менее специфичны и преимущественно отвечают за связывание Т-клеточного рецептора с МНС [5].

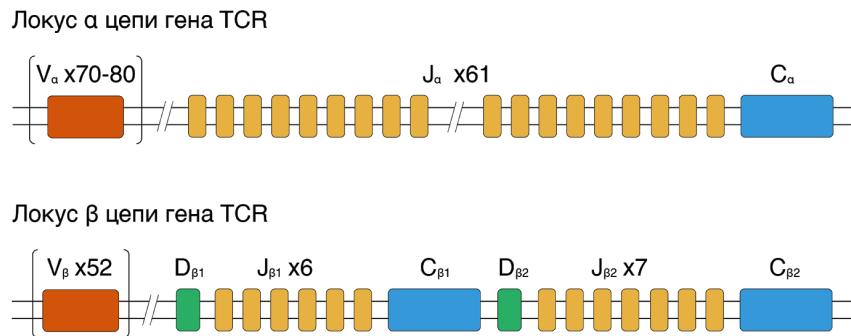
Субъединицы TCR агрегированы с мембранным полипептидным комплексом CD3. CD3 образован четырьмя типами полипептидов —  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  и  $\zeta$ . Субъединицы  $\gamma$ ,  $\delta$  и  $\epsilon$  кодируются тесно сцепленными генами и имеют близкую структуру. Каждая из них образована одним константным иммуноглобулиновым доменом, трансмембранным сегментом и длинной (до 40 аминокислотных остатков) цитоплазматической частью. Цепь  $\zeta$  имеет небольшой внеклеточный домен, трансмембранный сегмент, и большой цитоплазматический домен. В некоторых случаях вместо цепи  $\zeta$  в состав комплекса входит цепь  $\eta$  - более длинный продукт того же гена, полученный путем альтернативного сплайсинга. Белки комплекса CD3 не определяют специфичность рецептора к антигену, поскольку их структура не имеет переменных участков. Распознавание антигена является исключительно функцией TCR, а CD3 обеспечивает передачу сигнала в клетку [7].

Трансмембранный сегмент каждой из субъединиц CD3 содержит отрицательно заряженный аминокислотный остаток, а TCR – положительно. За счет электростатических взаимодействий они объединяются в общий функциональный комплекс Т-клеточного рецептора. На основании стехиометрических исследований и измерения молекулярной массы комплекса установлен его состав  $(\alpha:\beta)2+\gamma+\delta+\epsilon2+\zeta2$ .

### 2.1.2. Устройство генов Т-клеточных рецепторов

Организация генов TCR в целом гомологична организации генов иммуноглобулинов. TCR $\alpha$  locus подобен locus, кодирующему легкие цепи иммуноглобулинов, и содержит V $\alpha$  (англ. *variable*), J $\alpha$  (англ. *joining*) и C $\alpha$  (англ. *constant*) генные сегменты. TCR $\beta$  locus гомологичен locus, кодирующему тяжелые цепи иммуноглобулинов, и помимо V $\beta$ , J $\beta$  и C $\beta$

сегментов включает в себя  $D\beta$  (англ. *diversity*) генные сегменты (Рисунок 2).  $V\alpha$  и  $V\beta$  генные сегменты у человека распределены по семействам на основании гомологии нуклеотидных последовательностей: 32 семейства для  $V\alpha$  и 25 семейств для  $V\beta$  генных сегментов.



**Рисунок 2.** Структура  $TCR\alpha$  и  $TCR\beta$  локусов генов Т-клеточных рецепторов человека.

Основное отличие генов Т-клеточных рецепторов от генов иммуноглобулинов заключается в том, что эффекторные функции В-клеток реализуются через секретируемые антитела. Разные изоформы консервативного (С) участка тяжелых цепей антител запускают различные эффекторные механизмы. Функции Т-клеток, напротив, зависят от межклеточных контактов и не связаны напрямую с Т-клеточными рецепторами, которые необходимы лишь для узнавания антигена. По этой причине консервативные участки  $TCR\alpha$  и  $TCR\beta$  локусов, кодирующие трансмембранные полипептиды, устроены намного проще, чем гомологичные им локусы тяжелых цепей иммуноглобулинов. Существует одна изоформа для  $C\alpha$  сегмента и две изоформы для  $C\beta$  сегментов, обладающие высокой степенью гомологии и транслируемые продукты которых не имеют функциональных различий [1].

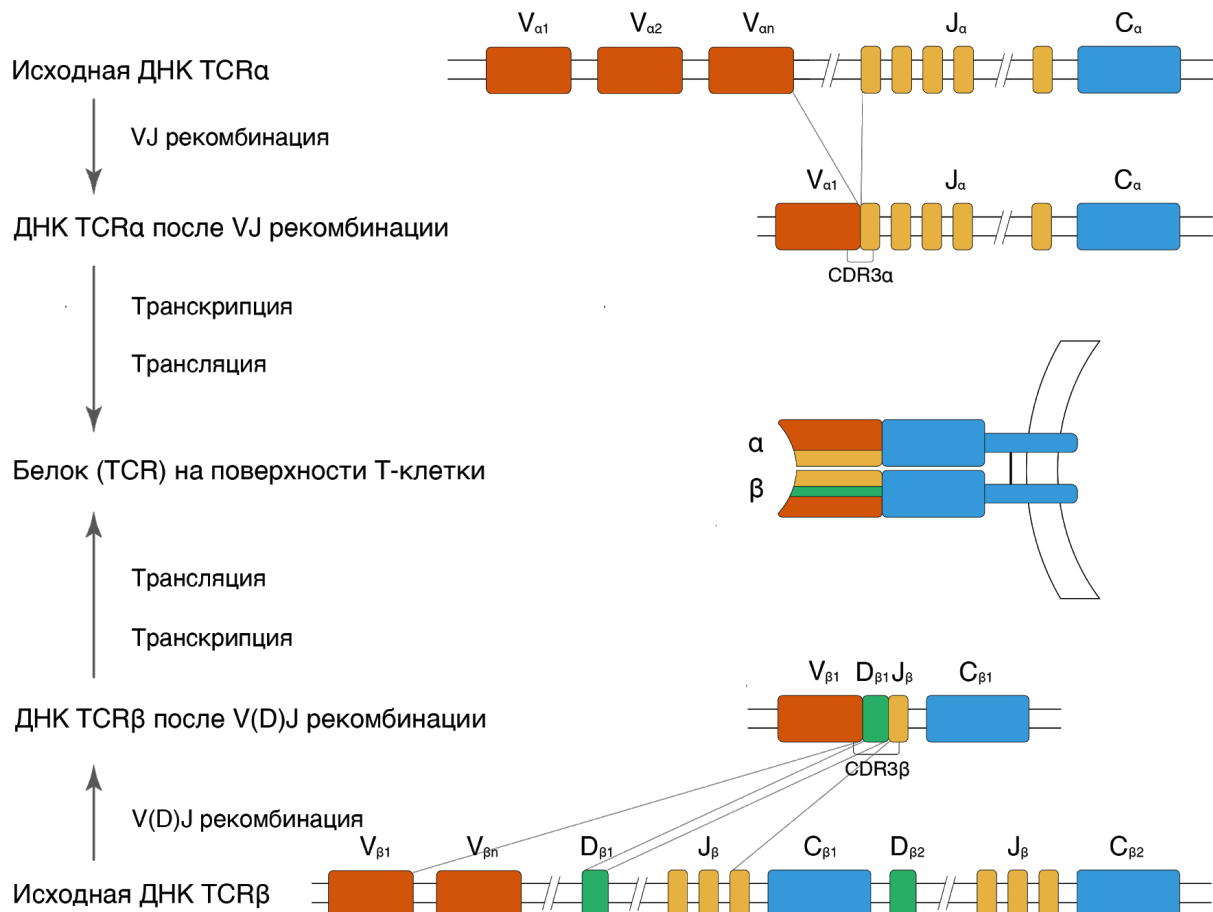
Центральная часть сайта связывания антигена у Т-клеточных рецепторов образована третьей гипервариабельной петлей (CDR3), которая кодируется V, J и D сегментами  $TCR\alpha$  и  $TCR\beta$  локусов. Периферическая часть

сайта связывания антигена образована CDR1 и CDR2 петлями, которые кодируются  $V\alpha$  и  $V\beta$  сегментами генов TCR.

Организация TCR $\gamma$  и TCR $\delta$  локусов Т-клеточных рецепторов в целом очень схожа с организацией TCR $\alpha$  и TCR $\beta$  локусов, однако, имеется и ряд существенных отличий. Кластер генных сегментов, кодирующих  $\delta$ -цепь, располагается внутри TCR $\alpha$  локуса, между  $V\alpha$  и  $J\alpha$  генными сегментами.  $V\delta$  генные сегменты перемежаются с  $V\alpha$  сегментами, но преимущественно сосредоточены в 3'-концевой части локуса. И поскольку  $V\alpha$  генные сегменты устроены таким образом, что при их перестройке происходит вырезание промежуточной ДНК, любые генные перестройки в  $\alpha$ -локусе приводят к потере  $\delta$ -локуса. Также у TCR $\gamma$  и TCR $\delta$  локусов наблюдается значительно меньшее число  $V$  сегментов, чем у любого из TCR $\alpha$  или TCR $\beta$  локусов. Поэтому разнообразие  $\delta$ -цепей TCR в основном сосредоточено в  $J\delta$  генных сегментах.

Сложное устройство генов TCR позволяет сохранить огромное рецепторное разнообразие Т-клеток в ограниченном по размеру геноме. Изначально гены Т-клеточных рецепторов не кодируют функциональные белковые последовательности. Функциональные последовательности рецепторов формируются за счет особых перестроек генных сегментов – сайт специфической V(D)J рекомбинации – в процессе созревания Т-лимфоцитов в тимусе (Рисунок 3). Правильная последовательность рекомбинации обеспечивается особыми последовательностями RSSs (англ. *recombination signal sequences*), фланкирующими V, D и J генные сегменты с обеих сторон. Последовательности RSSs содержат по три элемента: консервативный гептамер 5'-CACAGTG-3', соединительный участок (спейсер) из 12 или 23 нуклеотидов и дополнительный консервативный фрагмент из девяти нуклеотидов 5'-ACA AAA ACC-3'. Последовательность соединительного участка не является строго консервативной, но число нуклеотидов в нем постоянно – 12 или 23, что соответствует одному или двум виткам молекулы ДНК, соответственно. Эта закономерность строения сигнальных

последовательностей задает правильную ориентацию и определяет специфичность перестройки генов Т-клеточных рецепторов: V(D)J рекомбинация генных сегментов происходит только между двумя RSSs с разной длиной соединительного участка – так называемое “правило 12/23”.



**Рисунок 3.** Схема V(D)J рекомбинации генов TCR $\alpha$  и TCR $\beta$  и формирования Т-клеточного рецептора.

В рекомбинации задействованы несколько ферментов, наиболее важными из которых являются RAG1 и RAG2 (англ. *recombination activating genes*) и терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза (англ. *terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT*). Белки RAG распознают последовательности RSSs двух сегментов, связываются с ними и стягивают их вместе. После этого они инициируют образование двухцепочечных разрывов в молекуле ДНК между кодирующей последовательностью генного сегмента и RSS.

Впоследствии “тупые” концы сегментов замыкаются с образованием шпилек, а лишние последовательности генных сегментов удаляются. На следующем этапе шпильки расщепляются в случайном месте, образуя палиндромную последовательность (P) на концах генных сегментов. Перед восстановлением образовавшихся разрывов концы генных сегментов подвергаются форматированию: некоторое количество случайных нуклеотидов отщепляется вследствие экзонуклеазной активности и добавляется с помощью терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (TdT). Подобное процессирование концевых участков генных сегментов существенно увеличивает общее разнообразие Т-клеточных рецепторов, основанное на стохастическом выборе V, D и J генных сегментов. Участок, приходящийся на стык между V и J генными сегментами, содержит в себе наибольшее разнообразие репертуара TCR и соответствует гипервариабельному фрагменту CDR3 TCR $\alpha$  и TCR $\beta$  локусов. На завершающем этапе V(D)J рекомбинации ДНК лигаза IV восстанавливает разрывы и сшивает концы генных сегментов вместе, формируя новую последовательность ДНК, соответствующую вариабельному доменту Т-клеточного рецептора.

### **2.1.3. Созревание Т-клеток и Т-клеточных рецепторов**

Т-лимфоциты развиваются из тотипотентных гемопоэтических стволовых клеток костного мозга. Клетки-предшественники мигрируют через кровотоки из костного мозга в тимус, где происходят их дифференцировка и созревание. Именно поэтому эти клетки называют тимус-зависимыми (Т) лимфоцитами или Т-клетками. Развитие Т-клеток происходит под строгим контролем клеток тимуса [8].

Тимус располагается в верхней передней части грудной клетки, чуть выше сердца. Он состоит из многочисленных долек, каждая из которых разделена на внешний кортикальный слой – тимусный кортекс – и внутренний мозговой – медулу. Кортекс, в основном, содержит незрелые молодые Т-

лимфоциты и отдельные макрофаги, в то время как в медуле сосредоточены более зрелые Т-лимфоциты, наряду с дендритными клетками и макрофагами. Необходимое для созревания Т-клеток микроокружение обеспечивается стромой тимуса – особой эпителиальной сетью, в которую погружены молодые Т-клетки [9].

Поступившие в тимус клетки-предшественники через Notch-рецепторы получают сигнал, который запускает транскрипцию специальных генов. Каскады реакций, запускаемые Notch-рецепторами, широко распространены среди животного мира и часто отвечают за дифференциацию клеток разных тканей. Непосредственно в развитии лимфоцитов они отвечают за выбор пути дифференцировки клеток-предшественников в В- или Т-клетки [10] и дальнейшую судьбу Т-клеточной линии:  $\alpha:\beta/\gamma:\delta$  и CD4/CD8 дифференцировку Т-клеток [11].

Несмотря на то, что в тимус ежедневно мигрирует огромное число клеток-предшественников, лишь небольшая часть из них развивается в зрелые Т-клетки. Клетки предшественники в процессе дифференцировки проходят несколько этапов развития, и незрелые Т-клетки, не прошедшие стадии промежуточной селекции, гибнут по механизму апоптоза [22]. Этапы созревания Т-клеток выделяют на основании характерных изменений в структуре генов TCR, их экспрессии и экспрессии особых поверхностных белковых комплексов, таких как CD3 или ко-рецепторных белков CD4 и CD8. Изменения на поверхности клеток несут информацию об их функциональной зрелости и зачастую используются в качестве маркера на разных этапах дифференцировки Т-клеток. На ранних этапах развития выделяют две разные линии Т-клеток –  $\alpha:\beta$  и  $\gamma:\delta$ , которые отличаются экспрессией типов цепей TCR. Позднее  $\alpha:\beta$  группа разделяется на две подгруппы – CD4 Т-клетки и CD8 Т-клетки.

Предшественники Т-лимфоцитов, впервые попавшие в тимус, практически не несут на мембранах свойственные зрелым клеткам рецепторы, и их гены еще не подверглись перестройке. Взаимодействие этих клеток со



стромой тимуса является инициирующей стадией дифференцировки Т-клеток и выражается в экспрессии начальных, специфичных для Т-клеток поверхностных белков – CD44 и CD25. Однако клетки-предшественники пока еще не содержат на мембранах отличающие Т-лимфоциты белки – рецепторный комплекс CD3 и ко-рецепторные белковые комплексы CD4 или CD8. Именно поэтому эти клетки называют «двойными негативными» тимоцитами (англ. “*double-negative*” *thymocytes*, *DN*). В зрелом тимусе популяция DN тимоцитов составляет до 60% от всех тимоцитов. Около 20% из них впоследствии дифференцируются в  $\gamma:\delta$  Т-клетки, а еще 20% – в особую линию  $\alpha:\beta$  Т-клеток, экспрессирующую NK1.1 рецептор и отличающуюся низким разнообразием Т-клеточных рецепторов. Данная популяция клеток, получившая название iNKT-клетки (инвариантные NKT клетки) принимает участие в иммунном ответе на самых ранних стадиях, и их рецепторы в отличие от обычных  $\alpha:\beta$  TCR отвечают за распознавание CD1, а не MHC комплекса. Оставшиеся 60% популяции «двойных негативных» тимоцитов развиваются в основную линию Т-клеток, несущих на своих мембранах  $\alpha:\beta$  TCR.

На стадии «двойных негативных» тимоцитов наблюдаются начальные изменения локуса  $\beta$  цепи генов TCR, которые заключаются в перестройке V $\beta$ , J $\beta$  и D $\beta$  (V(D)J рекомбинации) генных сегментов и завершаются образованием кодирующей последовательности  $\beta$  цепи TCR. Клетки с успешно прошедшей рекомбинацией и экспрессией функциональной  $\beta$  цепи TCR переходят к следующему этапу дифференцировки, все остальные погибают по механизму апоптоза.

Экспрессированная  $\beta$  цепь спаривается с аналогом  $\alpha$  цепи, который называется предшественником  $\alpha$  цепи TCR, и образует пред-Т-клеточный рецептор (англ. *pre-TCR*). Вскоре происходит димеризация двух разных *pre-TCR*, которая приводит к экспрессии CD3, CD4 и CD8 белковых комплексов на мембранах клеток и блоку клеточного деления. Эти клетки были названы «двойными позитивными» тимоцитами (англ. “*double-positive*” *thymocytes*,

DP). На стадии «двойных позитивных» тимоцитов происходят генные перестройки локуса  $\alpha$  цепи генов TCR, успешная перестройка которого завершается экспрессией  $\alpha$  цепи и сборкой функционального  $\alpha:\beta$  T-клеточного рецептора [26].

«Двойные позитивные» тимоциты экспрессируют TCR на очень низком уровне. Большинство из этих рецепторов не способны узнавать пептид, связанный с МНС-комплексом антиген-презентирующих клеток, поэтому они не проходят селекцию и погибают по механизму апоптоза [22]. Лишь небольшая часть всей популяции «двойных позитивных» тимоцитов (около 2%), которые способны распознавать презентируемый в составе МНС антиген, выживает, проходит дальнейший отбор и начинает экспрессию T-клеточных рецепторов на высоком уровне. Параллельно с этим происходит блок экспрессии одного из двух поверхностных ко-рецепторных комплексов – CD4 или CD8. Такие клетки называются «одинарными позитивными» тимоцитами (англ. *“single-positive” thymocytes*). После завершения процессов дифференцировки зрелые тимоциты покидают тимус и формируют периферический репертуар T-клеточных рецепторов [12].

Тимоциты на разных стадиях развития располагаются в разных компартментах тимуса. Большинство процессов дифференцировки T-клеток происходит в кортикальном слое, в то время как зрелые «одинарные позитивные» тимоциты сосредоточены в мозговом слое тимуса. Клетки-предшественники по кровеносному руслу сначала попадают кортикомедуллярную область тимуса после чего мигрируют к внешней коре кортекса. В этой субкапсулярной области тимуса происходит интенсивное деление мигрирующих клеток – «двойных негативных» тимоцитов. Эти клетки представляют собой непосредственных предшественников тимоцитов, которые впоследствии образуют все существующее многообразие популяций T-клеток. Ближе к глубинным зонам кортекса располагаются «двойные позитивные» тимоциты. Кортикальная строма образована особыми эпителиальными клетками, которые экспрессируют на своих поверхностях

МНС комплексы класса I и II. Кортикс тимуса плотно упакован тимоцитами, каждый из которых окружен кортикальными эпителиальными клетками. Взаимодействие между МНС комплексами кортикальных эпителиальных клеток и рецепторами развивающихся Т-клеток играет важнейшую роль в позитивной селекции и дифференцировке последних [21].

После отбора развивающиеся Т-клетки мигрируют из кортекса в медуллу. Медулла содержит значительно меньшее число тимоцитов, чем кортекс. В основном медуллярная популяция Т-клеток представлена молодыми «одинарными позитивными» тимоцитами, которые в скором времени покидают тимус. Медулла играет важную роль в негативной селекции клеток. Мозговой слой тимуса содержит дендритные клетки, практически отсутствующие в кортикальном слое, которые отвечают за экспрессию особых ко-стимулирующих молекул. Кроме того, специальные медуллярные эпителиальные клетки принимают участие в презентации периферических антигенов, также необходимых для негативной селекции Т-клеток.

Т-клетки с  $\alpha:\beta$  и  $\gamma:\delta$  рецепторами развиваются от общего предшественника, но существенно различаются между собой.  $\gamma:\delta$  TCR располагаются преимущественно в эпителиальных и слизистых тканях, у них отсутствует экспрессия ко-рецепторных комплексов CD4 или CD8 и также, в противовес  $\alpha:\beta$  TCR, мало известно о лигандах, которые они способны узнавать. Предполагается, что работа  $\gamma:\delta$  TCR не связана с взаимодействием с МНС комплексами антигенпрезентирующих клеток. Перестройки  $\beta$ ,  $\gamma$  и  $\delta$  локусов в развивающихся тимоцитах начинаются практически одновременно, и расхождение линий развития от одного предшественника происходит только после строго определенных генных перестроек. Поэтому часто случается, что зрелые  $\gamma:\delta$  Т-клетки содержат уже перестроенные, но не транскрибируемые гены  $\beta$  цепи TCR. Точно также зрелые  $\alpha:\beta$  Т-клетки могут содержать в неактивном состоянии подвергнутые генным перестройкам  $\gamma$ -цепи TCR [12].

Выбор клетки-предшественника  $\alpha:\beta$  или  $\gamma:\delta$  линии развития зависит от того, какой тип рецептора – функциональный  $\gamma:\delta$  рецептор или пред-Т-

клеточный рецептор – был экспрессирован первым на стадии «двойных негативных» тимоцитов. Образование pre-TCR является статистически более вероятным, поскольку для формирования  $\gamma:\delta$  рецептора необходимы функциональные перестройки в обоих  $\gamma$  и  $\delta$  локусах генов TCR, в то время как для формирования пред-Т-клеточного рецептора нужны перестройки лишь в  $\beta$  локусе генов TCR. Если первым синтезировался  $\gamma:\delta$  рецептор, то предшественник Т-клеток переключается на развитие  $\gamma:\delta$  линии, блокирует экспрессию CD4 и CD8 ко-рецепторных комплексов и покидает тимус, не проходя позитивную и негативную селекцию. Если же первым синтезировался pre-TCR, то клетка переходит на линию развития  $\alpha:\beta$  Т-клеток и продолжает экспрессию CD4 и CD8 ко-рецепторных комплексов [15].

В большинстве тимоцитов перестройки локусов  $\beta$  цепи генов TCR успешно завершаются до того, как аналогичные перестройки пройдут в  $\gamma$  и  $\delta$  локусах генов TCR. Экспрессия pre-TCR подавляет дальнейшие генные перестройки, вызывает пролиферацию тимоцитов, экспрессию ко-рецепторных комплексов и стимулирует начало генных перестроек в локусе  $\alpha$  цепи. В процессе рекомбинантных перестроек генов  $\alpha$  цепи TCR происходит вырезание и удаление генных сегментов, кодирующих  $\delta$  цепи, которые, как известно, располагаются внутри  $\alpha$  локуса. Этот механизм обеспечивает экспрессию Т-клеточных рецепторов только одного типа (либо  $\alpha:\beta$ , либо  $\gamma:\delta$ ) на поверхности одного тимоцита [12].

После успешного прохождения всех этапов дифференцировки и селекции зрелые Т-клетки направляются в периферические лимфоидные органы и ткани, тесно контактирующие с окружающей средой (эпителий, слизистые оболочки), где принимают участие в формировании иммунной системы организма [27]. Эффективность и сбалансированность адаптивной иммунной защиты организма от инфекционных и онкологических заболеваний в значительной степени определяется функциональным и рецепторным разнообразием Т-лимфоцитов [11]. Каждый клон Т-лимфоцитов кодирует уникальный Т-клеточный рецептор, потенциально способный

распознать чужеродный антиген в составе молекулы МНС, и определяющий специфичность адаптивного иммунного ответа. Высокое индивидуальное разнообразие наивного репертуара TCR (более 10 миллионов уникальных вариантов для каждого человека [28]) является залогом того, что для новой инфекции или онкологического заболевания найдутся клоны Т-лимфоцитов, специфично распознающие антигены, характерные для данного патогена или патологических клеток. Антиген-специфичные Т-лимфоциты активно размножаются и присутствуют в организме и периферической крови в повышенных концентрациях, причем клетки памяти могут сохранять жизнеспособность в течение десятков лет. Таким образом, индивидуальный репертуар Т-клеточных рецепторов определяет эффективность иммунной защиты, диапазон распознаваемых антигенов, особенности патологических состояний иммунитета и, более того, содержит в себе потенциально читаемую информацию о многих инфекционных, онкологических, и аутоиммунных заболеваниях данного пациента [29].

## 2.2. Старение иммунной системы

Достижения в области технологий и здравоохранения позволили значительно улучшить качество жизни и ожидаемую продолжительность жизни всего человечества. Примерно до середины 20-го века инфекционные заболевания оставались основной причиной высокой смертности среди людей. Проведение массовых кампаний вакцинации, внедрение антибиотиков и противовирусных препаратов, применение передовых методов общественного здравоохранения позволили значительно сократить уровень заболеваемости и смертности от вирусных и бактериальных инфекций. Болезни сердца, легких, диабет и многие другие расстройства иммунитета, считавшиеся ранее смертельными, стали управляемыми хроническими заболеваниями. В совокупности все это вызвало рост ожидаемой продолжительности жизни – с 50 лет в 1900-х годах и до 70 лет и больше в настоящее время.

Увеличение продолжительности жизни неизбежно привело к увеличению среднего возраста населения мира. Это, в свою очередь, вызвало значительный рост заболеваний, ассоциированных с возрастом. На сегодняшний день инфекционные заболевания остаются в числе 10 основных причин смертности среди пожилого населения. И старение иммунной системы является ключевым явлением, лежащим в основе этой уязвимости.

Нормальное функционирование иммунной системы имеет решающее значение для поддержания оптимального уровня жизнедеятельности организма. Со временем во многих клетках, тканях и органах накапливаются изменения, влияющие на способность организма в целом поддерживать гомеостаз и реагировать на стресс. К сожалению, изменения затрагивают и иммунную систему. Старение иммунной системы проявляется в снижении эффективности вакцинации, ростом заболеваемости раком и аутоиммунными заболеваниями, а также увеличением заболеваемости и смертности от разнообразных инфекций среди пожилых людей [12,13]. Поскольку иммунная система представляет собой чрезвычайно сложную и высоко

интегрированную структуру, регулирующую в пространстве и во времени многоуровневыми сигнальными каскадами и межклеточными взаимодействиями, даже небольшие нарушения в серии сигнальных событий внутри одной клетки способны привести к серьезным повреждениям иммунитета в целом.

Возрастные изменения были выявлены практически в каждом известном аспекте иммунной системы – от первоначального контакта с микробным патогеном, вплоть до его устранения и формирования защитной иммунной памяти. Так, например, недавно были описаны дефекты во врожденном иммунитете [14–16]. Они включали в себя дефицит функций гранулоцитов, макрофагов и NK-клеток [15,16], уменьшенную или в целом измененную функцию рецепторов врожденного иммунитета [17] и другие возрастные изменения. Однако общее образование клеток врожденного иммунитета у пожилых людей в основном остается неизменным, а иммунитет в старости характеризуется продукцией провоспалительных медиаторов.

### **2.2.1. Инволюция тимуса**

Одним из наиболее заметных возрастных изменений в организме является инволюция тимуса, центрального органа иммунной системы, отвечающего за формирование наивного пула Т-клеток. Во время образования наивных Т-клеток клетки-предшественники мигрируют из костного мозга в тимус, где они дифференцируются в функционально зрелые Т-клетки для последующего экспорта на периферию. Структура и функция стромы тимуса определяет способность тимуса вырабатывать Т-клетки, предоставляя особое окружение, способствующее развитию Т-клеток. Тимус формируется во время внутриутробного развития и достигает максимальной продуктивности в раннем постнатальном периоде жизни. С возрастом, вследствие происходящей инволюции, тимус начинает постепенно уменьшаться в размерах и

демонстрирует минимальную и незначительную активность в пожилом возрасте.

Недавно были подробно рассмотрены возрастные изменения, затрагивающие тимус [18–20]. У человека этот орган начинает терять свою активность уже в молодом возрасте, причем изменения проявляются еще до полового созревания и, по некоторым данным, даже вскоре после рождения [21,22]. У мышей инволюция тимуса происходит более постепенно, тем не менее актуальным остается вопрос, насколько хорошо сохраняется продукция наивных Т-клеток после 15-месяцев жизни у лабораторных мышей C57BL/6 (наиболее хорошо изученная животная модель). Актуальные данные свидетельствуют о том, что ранняя инволюция тимуса включает первичный дефект стромы тимуса, в результате чего один или несколько компонентов эпителиальных клеток, возможно, предшественники эпителиальных клеток или стволовые клетки, оказываются подвержены старению. Меняется экспрессия ключевых факторов дифференцировки и роста эпителиальных клеток тимуса, таких как главный регулятор транскрипции FoxN1 и фактор роста кератиноцитов (англ. *keratinocyte growth factor, KGF*). В соответствии с этим гистологические изменения в инволюирующем тимусе проявляются в уменьшении объемов как кортикальной, так и медуллярной областей, дезорганизации эпителиальной клеточной архитектуры и кортико-медуллярного соединения и замещении стромы жировой тканью. Остается неясным, связано ли последнее наблюдение с истинной эпителиально-мезенхимальной трансдифференцировкой или со смертью/отсутствием продукции эпителиальных клеток и разрастанием жировой ткани [19]. Адипоциты также способны продуцировать ряд провоспалительных цитокинов, влияющих на тимопоэз, что в результате выражается в обратной корреляции между замещением тимуса жировой тканью и функцией тимуса. Следовательно, увеличение адипоцитов в тимусе может ускорить и усугубить потерю функции тимуса с возрастом, независимо от исходной причины увеличения числа жировых клеток.



Начальные изменения в тимусе усугубляются дефектами гемопоэтических стволовых клеток, которые проявляют уменьшенную дифференцировку в направлении лимфоидной линии и демонстрируют небольшую продукцию общих лимфоидных предшественников (англ. *common lymphoid precursors, CLP*) и повышенную миелоидную дифференцировку [18]. Также неясно, сталкиваются ли поздние предшественники, дифференцированные в сторону лимфоидной линии, с трудностями при заселении старого тимуса из-за внутренних клеточных дефектов или же из-за дальнейших стромальных изменений, которые делают ее менее пригодной для заселения новыми клетками. Известно, что такие поздние предшественники проявляют пониженный потенциал дифференцировки, что наводит на мысль об их клеточных дефектах при старении. Так, в одной из работ исследователи использовали ранние предшественники Т-клеток (англ. *early T-cell precursor, ETP*), выделенные из молодых и старых мышей, для заселения эмбриональных тимусов. Обнаружилось, что количество дифференцированных клеток из ETP у старых мышей было в 10 раз ниже, чем у молодых [23]. И независимо от количества наблюдаемых дефектов и их конкретной природы все они приводили к уменьшению экспорта новых наивных Т-клеток на периферию. Интересно, что даже после созревания CD4<sup>+</sup> недавние эмигранты тимуса (англ. *recent thymic emigrants, RTE*) старых мышей, возможно, не способны заселить периферический пул Т-клеток так же хорошо, как их более молодые коллеги [24].

### **2.2.2. Поддержание Т-клеточного пула на периферии**

Вне зависимости от точного механизма (или механизмов) инволюция тимуса сводится к одному результату – ограниченной, и в конечном счете незначительной, продукции новых наивных Т-клеток. Вследствие этого возникает справедливый вопрос, как долго функционирует тимус у разных видов. В недавней работе исследователи сравнили уровень продукции

наивных Т-клеток у мышей и людей [25] и пришли к выводу, что относительно продолжительности жизни тимус у мышей вносит гораздо более заметный вклад в динамику репертуара Т-клеток, тогда как у людей поддержание пула Т-клеток во взрослом возрасте в значительной степени осуществляется за счет периферической пролиферации клеток. Полученные результаты согласуются с наблюдениями за стрессоустойчивостью Т-клеток долгоживущих видов. Например, процент гибели человеческих Т-клеток после выделения из крови намного ниже, чем у мышинных Т-клеток, их можно инкубировать в течение ночи *in vitro* или замораживать/размораживать без серьезной потери функциональности [26]. Также результаты из работы [25] согласуются с данными о том, что периферический компартмент CD8 Т-клеток не может быть восстановлен после опосредованной деплеции лимфоцитов у *Macaca flavicularis* возрастом 10-16 лет независимо от того, были ли животные тимэктомизированы или нет [27].

Инволюция тимуса накладывает значительную нагрузку на периферический пул Т-клеток, поскольку последние вынуждены поддерживать иммунную защиту организма на протяжении всей оставшейся жизни без возможности подкрепления новыми наивными Т-клетками. Поддержка периферических Т-клеток зависит от низкоинтенсивной подпороговой стимуляции через Т-клеточный рецептор и/или стимуляции гомеостатическими цитокинами, IL-7, который необходим для выживания наивных Т-клеток (но может использоваться и клетками памяти) и IL-15, который необходим для поддержания клеток памяти [28]. В процессе этого взаимодействия, которое обычно состоит из слабых тонических сигналов, редко приводящих к делению, клетки поддерживают существующий фенотип и функцию в соответствии с их предыдущим состоянием дифференцировки. Стоит отметить, что относительный или абсолютный избыток цитокинов выражается в усилении гомеостатической пролиферации (англ. *homeostatic proliferation, HP*) и часто приводит к изменению фенотипического и функционального статуса клеток, при этом наивные клетки приобретают

фенотип, схожий с фенотипом Т-клеток памяти. Несколько работ прошедших лет свидетельствуют о том, что старение затрагивает процессы гомеостаза наивных Т-клеток и приводит к истощению и гибели периферического репертуара наивных Т-клеток. Например, как наивные CD4 Т-клетки человека [29], так и CD8 Т-клетки приматов, демонстрируют повышенный уровень гомеостатической пролиферации при старении [30], которая потенциально может превращать наивные Т-клетки в клетки виртуальной памяти (англ. *virtual memory, VM*). Формальным доказательством массовости этого явления служит наблюдение на мышах, для которых было показано, что наивные стареющие предшественники Т-клеток при отсутствии иммунизации часто приобретают фенотип и функцию клеток виртуальной памяти [31]. Эти результаты были впоследствии подтверждены другими исследователями [32,33], и было показано, что у мышей дикого типа клетки VM доминируют в компартменте клеток центральной памяти [33]. Накапливающиеся данные свидетельствуют о том, что виртуальные клетки памяти старых мышей возникают по механизмам, отличным от тех, по которым образуются клетки VM у взрослых мышей, а также проявляют различия в функциях. Клетки виртуальной памяти взрослых мышей непосредственно демонстрируют превосходную эффекторную функцию и пролиферацию по сравнению с их истинно наивными (англ. *true naive, TNa*) аналогами [34]. Скорее всего, они возникают из-за неонатальной лимфоцитопении и вынуждены делиться и превращаться в VM в ответ на избыток IL-7 в практически “пустом” неонатальном периферическом компартменте у мышей [34,35], хотя и в некоторых случаях часть этих клеток также может возникать в молодом тимусе в ответ на стимуляцию IL-4 НКТ клетками [35]. Клетки VM у старых мышей дикого типа, напротив, проявляют увеличенную аффинность Т-клеточных рецепторов, судя по повышенному уровню экспрессии CD5 и уменьшенной диссоциации рМНС [31]. Более того, у трансгенных по TCR мышей эти клетки не накапливаются, если дополнительная перестройка генов Т-клеточных рецепторов была заблокирована отсутствием генов Rag [36].

Данное наблюдение указывает на важную роль лигандов TCR, управляющих накоплением этих клеток. В соответствии с этим, VM CD8 T-клетки как трансгенных, так и старых мышей дикого типа обнаруживают признаки функциональных изменений: они секретируют цитокины типа T1, но демонстрируют низкую пролиферацию по сравнению с их TNa аналогами [36]. В настоящее время проводятся эксперименты по выяснению, какие антигены управляют этим TCR-зависимым превращением и/или накоплением от наивного фенотипа к клеткам памяти при старении.

В отличие от явного численного снижения количества наивных CD8 T-клеток у стареющих мышей [37] и людей [38] компартмент CD4 T-клеток, по-видимому, сохраняется намного лучше, поскольку не показывает заметного снижения с возрастом, по крайней мере у CMV-негативных людей [38]. Однако указанная выше конверсия наивных клеток в компартмент VM по меньшей мере частично относится и к CD4 T-клеткам старых трансгенных мышей [36]. У человека аналоги мышинных возрастных CD8 VM T-клеток еще не были идентифицированы. Однако интересные результаты были описаны в работе Su et al. [39], в которой у людей разного возраста был обнаружен CD4 T-клеточный фенотип памяти, специфичный для различных вирусных антигенов, некоторые из которых (например, столбняк и оспа) вряд ли имели отношение к рассматриваемым субъектам. Хотя в настоящее время отсутствуют убедительные доказательства того, что у человека такие клетки накапливаются при старении, подобные результаты позволяют предположить о существовании чрезвычайно высокой кросс-реактивности T-клеточного репертуара [39,40]. Пока неясно, создает ли такая кросс-реактивность T-клеток защитный гетерологичный иммунитет [41] или старение делает эту перекрестную реактивность более выраженной, но такой механизм был предложен в качестве адаптивной особенности иммунной системы при старении [42].

### 2.2.3. Т-клеточный репертуар в старости

Поскольку количество наивных CD8 Т-клеток стремительно падает с возрастом, логично предположить, что разнообразие Т-клеточного репертуара снижается схожим образом. Действительно, был опубликован ряд работ, в которых сообщалось о падении разнообразия репертуара TCR у людей и мышей с возрастом [43–45]. Первоначально это было обнаружено при окрашивании клеток антителами на TCRV $\beta$  [46,47] и анализе CDR3 сегментов отдельных семейств TCR [48–50]. В последующих исследованиях использовались технологии ПЦР с единичных клеток [51] и высокопроизводительное секвенирование участков CDR3 Т-клеточных рецепторов [51–54].

Однако несмотря на безусловную информативность подобных исследований, все они обладают определенными ограничениями (хотя в значительной степени это относится к более ранним работам). Так, первые эксперименты на мышинных моделях и большая часть исследований на людях касались активированного репертуара Т-клеток в ответ на иммунизацию или инфекцию. В таких модельных экспериментах могли наблюдаться различия, связанные с поглощением антигена, его обработкой, презентацией, ко-стимуляцией и другими проблемами, не имеющие отношения к поддержанию наивного репертуара Т-клеток как такового. Другое ограничение заключается в том, что в многочисленных исследованиях анализировался только общий репертуар CD4, CD8 Т-клеток или тотальная популяция лимфоцитов организма в целом. Полученная информация относилась к общему разнообразию Т-клеточных рецепторов, без учета возрастных изменений, происходящих в популяции, что безусловно ухудшало интерпретацию данных. Также при этом часто использовались методы относительно низкого разрешения (обычно полиморфизм длины CDR3), что отрицательно сказывалось на качестве проведенного анализа. Дополнительное ограничение большинства подобных исследований также было связано с анализом разнообразия Т-клеточных рецепторов только на основании  $\beta$  цепи TCR и без

рассмотрения  $\alpha$  цепи (пусть и менее вариабельной, чем  $\beta$ , но не менее важной). Таким образом, в настоящий момент сложно назвать оптимальный высокопроизводительный подход, позволяющий оценивать изменение разнообразия репертуара Т-клеточных рецепторов с возрастом в отдельных популяциях Т-клеток.

Наиболее убедительные и хорошо воспроизводимые результаты для Т-клеточных репертуаров недавно были получены на тотальной популяции Т-клеток и общей популяции CD4 Т-клеток у людей [52]. В частности было показано практически линейное падение TCR $\beta$  репертуара с возрастом, со значительным сокращением разнообразия уже к 40 годам, и параллельное уменьшение доли наивных клеток, что согласуется с более ранними данными Naylor et al. [29]. Сравнив репертуары разных доноров, авторы обнаружили около 10000 “публичных” (т.е. пересекающихся между неродственными донорами) клонотипов Т-клеточных рецепторов среди топа 100000 клонов, численность которых коррелировала с общим разнообразием TCR и уменьшалась с возрастом. Более того, у пожилых людей возрастом старше 80 лет исследователи обнаружили увеличение процента наивных CD4 Т-клеток и увеличение разнообразия TCR по сравнению предыдущей когортой доноров возрастом около 60 лет. Это наглядно свидетельствует об возможных эффектах отбора и выживания наивных CD4 Т-клеток. Важным моментом этого исследования является демонстрация пониженного разнообразия в общей популяции CD4 Т-клеток, которые по сравнению с CD8 Т-клетками менее склонны к снижению численности в периферической крови человека с возрастом [38]. Это также свидетельствует о реальной потере разнообразия репертуара, а не обычной замене наивных CD4 Т-клеток менее разнообразными СМ (англ. *central memory*) и ЕМ (англ. *effector memory*) CD4 Т-клетками при старении. К сожалению, в вышеприведенном исследовании [52] напрямую не анализировались основные популяции Т-клеток (N, СМ, ЕМ), а также не учитывался СМV-статус доноров, который, как известно, при старении оказывает значительное влияние на разнообразие Т-клеточного

репертуара. Похожее по тематике недавнее исследование, проведенное на мышцах [55], имеет те же ограничения, поскольку в работе анализировали общие репертуары CD4 Т-клеток селезенки и костного мозга. Авторы пришли к интересному выводу, что в селезенке, но не в костном мозге, с возрастом наблюдается пониженное разнообразие TCR $\beta$  CD4 лимфоцитов. Далее исследователи заключили, что это связано с сопутствующей экспансией большого количества клонов.

Интересные результаты были получены в исследованиях, в которых для рассмотрения возрастных изменений Т-клеточных репертуаров использовались технологии ПЦР с единичных клеток (англ. *single-cell PCR*) и обратной транскрипции с последующей ПЦР для отдельных клеток (англ. *single-cell RT-PCR*). Так, в одной из работ были проанализированы TCR $\beta$  репертуары Т-клеток памяти и эффекторных Т-клетках мышцы на протяжении длительного времени после инфицирования LCMV [51]. Было показано резкое сокращение разнообразия репертуара, которое у одной из мышей было полным – то есть один клон был обнаружен в 100% последовательностей. И хотя масштаб этого исследования не был достаточно широким, сокращение разнообразия было поразительным. В другой работе ученые проанализировали репертуары TCR $\alpha$  и TCR $\beta$  единичных CD8 Т-клеток памяти, отвечающих за распознавание вируса гриппа. Было показано постепенное замещение с возрастом публичного репертуара, преимущественно состоящего из TRBV19/TRAV27 TCR, более уникальным и индивидуальным репертуаром для каждого донора [56]. Наблюдаемый процесс может служить причиной падения эффективности вакцинации среди пожилых индивидуумов. Именно поэтому в будущем при разработке любой Т-клеточной вакцины для эффективного иммунного ответа необходимо будет учитывать индивидуальные особенности репертуара пациента.

#### 2.2.4. Влияние CMV на Т-клеточный репертуар

На протяжении длительного времени известно, что у людей и мышей репертуар Т-клеток памяти находится под сильным влиянием CMV [57]. По разным оценкам вирусом инфицировано до 60–70% человеческой популяции, причем среди пожилых людей этот процент еще выше. Воздействие вируса проявляется в мощной экспансии [58,59] обеих эффекторных субпопуляций CD8 и CD4 Т-клеток [38,60,61], которая наиболее вероятно осуществляется через непосредственную стимуляцию широкого репертуара отвечающих Т-клеток [62]. Из этого следует, что в зависимости от наличия CMV люди (и другие животные, зараженные естественным или экспериментальным путем) будут подвержены принципиально разным моделям старения, что и было показано на TCR репертуарах CD8 Т-клеток [63–65]. В одной из работ такое серьезное обеднение Т-клеточного репертуара, вызванное CMV инфекцией, также связали с уменьшением продолжительности жизни [63], однако основы этого механизма остаются неизвестными.

Подход с использованием секвенирования генов TRAV и TRBV для отдельных CMV-специфичных CD8 Т-клеток памяти позволил выявить низкое разнообразие репертуара у индивидуумов с высоким титром антител против CMV (указывающий на обширную CMV инфекцию) [66]. Но в этом исследовании не оценивалось старение в качестве независимой переменной. Наконец, еще в нескольких работах ученые оценили влияние продолжительной CMV инфекции при иммунном ответе на заражение сторонними патогенами у старых мышей. Во всех трех исследованиях было показано снижение CD8 ответа на стороннюю инфекцию при наличии CMV [37,67,68]. Также в одной из работ исследователи обнаружили, что мыши с CMV при иммунном ответе на другие инфекции использовали индивидуальные TCR [37]. Вместе с тем недавно была опубликована работа, в которой у доноров пожилого возраста не было обнаружено существенных различий в разнообразии наивных репертуаров TCR в зависимости от CMV статуса [69]. По мнению исследователей, наблюдаемая экспансия больших



CMV-реактивных клонов в пожилом возрасте представляет собой обычное явление в контексте длительной латентной инфекции и не оказывает серьезного влияния на остальной репертуар Т-клеток. Хотя в настоящее время до конца неясно, в какой степени инфекция CMV сказывается на функционировании Т-клеточного репертуара в старости, этот факт представляет собой яркий пример внешнего воздействия на Т-клеточный репертуар.

### **2.2.5. Функциональные изменения в старых Т-клетках**

Происходящие возрастные изменения в Т-клеточном репертуаре сами по себе способны изменить аффинность TCR и тем самым негативным образом отразиться на эффективности функционирования старых Т-клеток. Тем не менее данные об изменении аффинности TCR при старении остаются противоречивыми. Так, в одной из работ было описано увеличение аффинности TCR к pMHC у старых мышей с помощью прямого анализа диссоциации pMHC [31]. В соответствии с этим у мышей не было показано снижение аффинности старых CD8 Т-клеток, отвечающих на инфекцию [70] или на продолжительную системную HSV [71]. Однако эти измерения проводились на пике первичного ответа эффекторных клеток, и, следовательно, не отображали взаимодействие наивных Т-клеток. Действительно, за последние 40 лет был накоплен список функциональных и сигнальных дефектов в старых Т-клетках включая данные о пониженной пролиферации Т-клеток, снижении эффекторной функции и образования иммунных синапсов, нарушения выработки ранних сигнальных интермедиатов, снижении активности транскрипционных факторов, определяющих судьбу Т-клеток, неполной дифференцировке эффекторов и т.д. [72–74]. Наиболее информативными являются исследования *in vitro* популяций отсортированных Т-клеток и работы *in vivo* по переносу тех же выделенных популяций от старых или взрослых мышей реципиентам с

дефицитом Т-клеток. Сосредоточив внимание на исследованиях такого рода, можно выявить четкие закономерности клеточных дефектов в наивных Т-клетках при старении. Так одной группой исследователей было показано, что *in vitro* стимулированные наивные старые CD4 Т-клетки демонстрируют нарушения передачи сигналов цитоскелета, поляризации, рекрутирования LAT и ZAP-70 и фосфорилирования CD3 $\xi$  [75]. Подобные исследования, к сожалению, не проводились на наивных CD8 Т-клетках. Haynes, Swain и их коллеги осуществили перенос CD4 недавних эмигрантов тимуса между старыми и взрослыми мышами и выяснили, что и окружающая среда, и внутренние дефекты Т-клеток оказывают влияние на эффективность иммунного ответа [76]. Этой же группой ученых было показано, что воспалительные цитокины могут преодолевать некоторые дефекты функции хелперов Т-клеток [77,78], однако точная мишень для этих цитокинов не была определена. На мышинной модели вируса лихорадки Западного Нила было продемонстрировано, что тотальный перенос CD8 или CD4 Т-клеток от старых мышей не обеспечивал защиту молодого реципиента Rag-KO, тогда как популяции взрослых донорских Т-клеток предоставляли защиту от вируса [79]. В этом эксперименте не применяли очищенные наивные Т-клетки, но впоследствии было показано, что количество WNV-специфических (и всех других) предшественников снижается с возрастом на 60–90% [31,36]. Эти результаты убедительно демонстрируют, что вне зависимости от увеличения аффинности TCR CD8 Т-клеток [31] или кросс-реактивности CD4 Т-клеток [39], которые при старении могут избирательно выживать и накапливаться, они не способны обеспечить эффективный иммунный ответ против вирусной инфекции. Также было показано, как небольшие CD8 Т-клеточные экспансии, возникающие у старых лабораторных мышей по неизвестным причинам [46,50], и чье появление усиливается при увеличении пролиферации периферических Т-клеток [80], отрицательно сказываются на эффективности новых первичных ответов, если они занимали TRBV семейство, необходимое для такого первичного ответа [81]. При этом Т-клеточные экспансии известной

специфичности, против определенного микроорганизма (в частности, вируса), демонстрировали слабый ответ на вторичную инфекцию [82]. Таким образом, развитие Т-клеточных экспансий в пожилом возрасте представляет собой результат прогрессирующей дисрегуляции вирус специфического компартмента Т-клеток памяти.

Неоднозначные изменения наблюдаются и в ответах Т-клеток памяти на новые и повторные инфекции в пожилом возрасте. С одной стороны, популяция клеток памяти, сформировавшаяся в молодом возрасте, по-видимому, гораздо лучше сохраняет свои функции по сравнению с такими же клетками, образовавшимися в старости в ответ на первичную инфекцию [42,83]. Слабая Т-клеточная экспансия и ограниченный ответ во время повторной инфекции у старых мышей наблюдали в CD8 Т-клетках, отвечающих на LCMV [84], листерию [70] и грипп [85], и в CD4 Т-клетках, отвечающих на модельные антигены [86]. Однако, с другой стороны также было показано, что индивидуумы, иммунизированные вакциной против оспы или перенесшие инфекцию в молодом возрасте, сохраняли устойчивые иммунные ответы CD8 Т-клеток на протяжении десятилетий [87], а также приобретали надежную защиту от инфекций других вирусов оспы [88].

В работе, посвященной исследованию трафика Т-клеток и его изменению с возрастом, было показано, что мобилизация кожного CD4 Т-клеточного иммунитета у пожилых людей была нарушена, в то время как в крови он оставался неповрежденным [89]. Однако из-за ограничений модели не удалось установить, были ли наблюдаемые изменения связаны с внутренними клеточными дефектами. В другой работе по изучению иммунного ответа на мышиную модели вируса лихорадки Западного Нила исследователи выявили снижение транспорта наивных CD4 Т-клеток у старых мышей [90]. Также было показано пониженное накопление лейкоцитов в дренирующих лимфатических узлах (англ. *draining lymph node, DLN*) у старых мышей в течение первых нескольких дней после инфекции. Это было связано с возрастными дефектами в локальной продукции цитокинов и хемокинов.

Таким образом, эти изменения приводят к задержке рекрутирования иммунных клеток и распознавания антигена, что ставит под угрозу формирование своевременных иммунных реакций и способствует повышенной восприимчивости к острой инфекции в пожилом возрасте. Поэтому изучение возрастных дефектов транспорта Т-клеток представляет собой интересную тему для последующих исследований.

При ответе на инфекцию в пожилом возрасте были обнаружены дефекты в дифференцировке CD8 и Th1 CD4 Т-клеток. При этом наблюдалась пониженная экспрессия важных эффекторных цитокинов, таких как IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , гранзим В [79,91] или IL-2 [92,93]. Меньше известно об изменениях в дифференцировке других Т-клеточных популяций, хотя скорее всего аналогичным образом нарушаются функции и Th2 CD4 Т-клеток [94,95], тогда как активность Th17 может увеличиваться [96] или уменьшаться [97,98]. Также было показано увеличение активности регуляторных Т-клеток (англ. *regulatory T-cells, Treg*) у мышей [99] и людей [100] в старости. В других работах исследователи сообщали об изменении соотношения Th17/Treg у людей [101] с увеличением доли Th17, однако, функциональные различия не были подтверждены. Напротив, в другом исследовании сообщалось о снижении доли Th17-клеток среди компартмента клеток памяти, но более высоком проценте наивных CD4 Т-клеток, продуцирующих IL-17 у пожилых доноров старше 65 лет по сравнению с молодыми людьми (моложе 40 лет) [102]. В целом, остается не до конца понятно, может ли старение приводить к избирательному предпочтению одной из субпопуляций Т-клеток за счет других.

Таким образом, в Т-клетках при старении наблюдаются множественные изменения, связанные с их образованием, дифференцировкой, активацией и периферической пролиферацией. Наименьшим изменениям подвергаются Т-клетки памяти, которые образуются в молодости и постепенно накапливаются с возрастом. Стоит отметить, что вышеуказанные изменения

могут быть незначительными по отдельности, но по мере накопления и взаимодействия друг с другом способны привести к эффекту многократного усиления.

В связи с этим возникает практический вопрос, можно ли сохранить и улучшить эффективность работы Т-клеток в пожилом возрасте. Потенциал для этого существует огромный. Обнаружены и в настоящее время проходят тестирование новые адъюванты, нацеленные на специфические рецепторы врожденного иммунитета [103]. В нескольких последних публикациях было показано, что агонисты TLR [103], адъюванты [104], цитокины [78] и живые аттенуированные вакцины [105] способны улучшить ответы Т-клеток и защиту иммунитета в целом у пожилых людей и животных. Также предпринимаются попытки трансдукции клеток определенными факторами транскрипции, однако вероятность практического применения такой терапии остается под вопросом. И поскольку с возрастом наблюдается падение доли наивных Т-клеток, только их омоложение способно восполнить утраченный резерв. Хорошей новостью является то, что при определенных условиях существует возможность вырастить заново старый тимус [106]. Однако стоит отметить, что инволюция тимуса представляет собой комплексный и очень сложный процесс, поэтому отдельные методы лечения вряд ли способны в полной мере восстановить совокупность его функций, включая надежный экспорт функциональных Т-клеток на периферию [20,106]. Исследования, направленные на улучшение функции Т-клеток с возрастом и, в частности, к полному омоложению выработки тимуса и производительности периферических Т-клеток, несомненно представляет собой чрезвычайно трудную, но в то же время интересную и практически полезную задачу.

### 3. Цели и задачи

Цель настоящей работы заключалась в исследовании возрастных изменений в репертуарах  $\beta$  цепей Т-клеточных рецепторов наивных Т-клеток человека. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Разработать метод, позволяющий проводить качественный анализ репертуаров Т-клеточных рецепторов, в том числе для небольшого стартового числа (несколько сотен) Т-клеток.
- 2) Подготовить библиотеки и с помощью высокопроизводительного секвенирования получить данные по тотальным репертуарам  $\beta$  цепей Т-клеточных рецепторов периферической крови здоровых доноров нескольких возрастных групп.
- 3) Провести сравнительный анализ структуры репертуаров  $\beta$  цепей Т-клеточных рецепторов доноров разного возраста.
- 4) Провести сортировку популяций CD4 и CD8 наивных Т-клеток для взрослых здоровых доноров разного возраста.
- 5) Подготовить кДНК библиотеки генов Т-клеточных рецепторов и с помощью высокопроизводительного секвенирования получить информацию о разнообразии репертуаров наивных Т-клеток для доноров нескольких возрастных групп.
- 6) Проанализировать возрастные изменения в структуре репертуаров Т-клеточных рецепторов нескольких популяций наивных Т-клеток для доноров разного возраста.

## 4. Материалы и методы

### 4.1. Оборудование и расходные материалы

Пластиковые пробирки SerMate объемом 50 мл (STEMCELL Technologies, Канада); нейлоновые 40  $\mu\text{m}$  фильтры для клеток (BD, США); камера Горяева (МиниМед, Россия); вакуумные пробирки Vacuette с ЭДТА для гематологии (Greiner Bio-One, Австрия); пластиковые пробирки объемом 5, 15 и 50 мл (SPL LifeSciences, Корея); автоматические пипетки переменного объема (Eppendorf, Германия; Gilson, Франция); твердотельный термостат Термит (ДНК-Технология, Россия); центрифуги Eppendorf MiniSpin, 5415R и 5804R (Eppendorf, Германия); мини-центрифуга FV-2400 (Biosan, Латвия); наконечники для пипеток (SSI, США); пластиковые пробирки 0.2 мл для обратной транскрипции и ПЦР (SSI, США); 1.5 мл пробирки (SSI, США); автоматические ПЦР-амплификаторы GeneAmp 9700 Thermal Cycler (Applied Biosystems, США), T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США); камера и источник питания для гель-электрофореза (Bio-Rad, США); система гель-документации Syngene G:Box (Syngene, США); флуориметр Qubit 3.0 (Invitrogen, США); проточный цитофлуориметр и клеточный сортер FACS Aria III (BD, США); секвенаторы MiSeq и HiSeq (Illumina, США).

### 4.2. Реактивы

Раствор фикоλλα ( $\rho = 1.077 \text{ г/см}^3$ , ПанЭко, Россия); раствор Хэнкса (ПанЭко, Россия); этиловый спирт 95 % (Ферейн, Россия); набор для выделения тотальной РНК из суспензии клеток RNeasy Micro kit (Qiagen, Германия); лизирующий буфер RLT (Qiagen, Германия); набор для очистки ДНК MinElute PCR purification kit (Qiagen, Германия); магнитные частицы AMPure XP beads (Beckman Coulter, США); урацил-ДНК-гликозилаза, UDG

(NEB, США); ДНК-полимераза HS Q5 (NEB, США); буфер (5x) для ДНК-полимеразы HS-Q5 (NEB, США); обратная транскриптаза (ревертаза) SMARTScribe (Clontech, США); буфер (5x) для обратной транскриптазы SMARTScribe (Clontech, США); дитиотреитол, DTT (Clontech, США); смесь dNTPs (Биосан, Россия); агароза для проведения гель-электрофореза (Хеликон, Россия); глицерин (Sigma, США); буфер для нанесения образцов ДНК на агарозный гель (0.1% бромфеноловый синий, 0.1% ксиленцианол, 30% глицерин); моноклональные антитела: CD3-eFluor450 (клон UCST1, eBioscience, США), CD45RA-FITC (клон JS-83, eBioscience, США), CD27-PC5 (клон O323, Beckman Coulter, США), CD4-PE (клон 13B8.2, Beckman Coulter, США), CD25-eFluor450 (клон BC96, eBiosciences, США), CD31-PC7 (клон WM59, eBiosciences, США).

Перечень использованных олигонуклеотидов приведен в Таблице 1. Все олигонуклеотиды, за исключением SMART-адаптера SmartNNNa, были синтезированы компанией Евроген (Россия). SMART-адаптер был синтезирован компанией IDT (США).



**Таблица 1.** Последовательности использованных в работе олигонуклеотидов.

№	Название	Последовательность
1	BCR4_short	GTATCTGGAGTCA TTGA
2	BCuni2	TGCTTCTGTGATGGCTCAAAACAC
3	ACR_st4	GTCTAGCACAGTTTGTGTC
4	ACR_st1	GTCACTGGATTTAGAGTTC
5	SmartNNNa	AAGCAGUGGTAUCAACGCAGAGUNNNNNUNNNNUCTT(rG)(rG)(rG)*
6	M1ss	AAGCAGTGGTATCAACGCA
7	dir_read2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGGTATCAACGCAGAG
8	TCR_bej_rev_read1	TCGTCCGCAGCGTCSAGATGTGTATAAGAGACAGACACACSTTKTTCAGGTCCCTC
9	TCR_acj_rev_read1	TCGTCCGCAGCGTCSAGATGTGTATAAGAGACAGGGTCSAGGGTTCTGGGATAT
10	pcr2_sh_N7XX	CAAGCAGAAGACGGGCATACGAGAGXXXXXXGTCCTCGTGGGCTCGG**
11	pcr2_sh_S5XX	AATGATACGGCGCACCCAGAGATCTACACXXXXXXTCGTCCGCAGCGGTCSAG**

\* UNNNNNUNNNNNNU – молекулярный баркод из 12 случайных (N) нуклеотидов, разделенных урацилами (U)

\*\* XXXXXXXXXX – уникальная последовательность адаптера из 8 нуклеотидов

## 4.3. Методы

### 4.3.1. Подбор когорт доноров и сбор образцов

Работа была одобрена комиссией по биоэтике и проводилась в соответствии с хельсинской декларацией. Все доноры были проинформированы об окончательной цели использования образцов их крови и дали письменное согласие.

Для исследования было отобрано 83 здоровых донора разного возраста (Таблицы 10-12) и 8 образцов пуповинной крови (англ. *umbilical cord blood*, *UCB*). От каждого донора был получен образец периферической венозной крови объемом от 10 до 20 мл в пробирках Vacuette с ЭДТА (Greiner Bio-One).

### 4.3.2. Выделение РВМС из периферической крови

Выделение периферических мононуклеарных клеток крови (англ. *peripheral blood mononuclear cells*, *PBMC*) из образца цельной крови проводили с помощью центрифугирования в градиенте фиколла в пробирках SepMate (STEMCELL Technologies). Все операции выполняли при комнатной температуре.

К образцу периферической крови человека добавляли один объем раствора Хенкса (ПанЭко) и тщательно перемешивали. В пробирку SepMate на 50 мл добавляли 15 мл фиколла (ПанЭко,  $\rho = 1.077 \text{ г/см}^3$ ), после чего разведенную кровь аккуратно наносили на фиколл. Образцы центрифугировали 20 минут при 1200 g. В пробирках после центрифугирования происходило расслоение: верхний прозрачный слой, представляющий собой разбавленную плазму крови, мутная интерфаза, представленная суспензией одноядерных клеток лейкоцитарной фракции (РВМС), и нижний красный осадок эритроцитов под фиколлом. Пипеткой аккуратно отбирали интерфазу с клетками и переносили в новую пробирку на 50 мл. Отобранную интерфазу с клетками разбавляли раствором Хенкса до 50 мл. Центрифугировали 20 минут при 350 g. Отбирали большую часть

супернатанта, клетки ресуспендировали в оставшемся объеме и повторяли отмывку в растворе Хенкса при тех же условиях. После отмывки осадок РВМС ресуспендировали в 1 мл раствора Хенкса, количество выделенных клеток подсчитывали с помощью камеры Горяева.

#### **4.3.3. Окрашивание клеток моноклональными антителами**

Все операции окрашивания клеток проводили при комнатной температуре.

РВМС (от 5 до 20 млн клеток) ресуспендировали в 100 мкл раствора Хенкса и добавляли флуоресцентно меченые антитела из расчета 1 мкл антитела на 1 млн окрашиваемых клеток. В работе были использованы следующие антитела:

- CD3-eFluor450 (eBioscience, клон UCHT1),
- CD45RA-FITC (eBioscience, клон JS-83),
- CD27-PC5 (Beckman Coulter, клон O323),
- CD4-PE (Beckman Coulter, clone 13B8.2),
- CD25-eFluor450 (eBiosciences, клон BC96),
- CD31-PC7 (eBiosciences, клон WM59).

Окрашивание антителами проводили в течение 20 минут в темноте. После инкубации, чтобы отмыть суспензию РВМС от несвязавшихся антител, клетки дважды промывали 2 мл раствора Хенкса с последующим центрифугированием в течение 5 минут при 350 g. После второй отмывки суспензию клеток пропускали через нейлоновый 40 мкм клеточный фильтр (BD), чтобы избавиться от клеточных агрегатов.

#### **4.3.4. Флуоресцентная сортировка Т-клеток (FACS)**

Гейтирование и сортировку целевых Т-клеточных популяций проводили на приборе BD FACS Aria III. Для сортировки клеток использовали 70  $\mu\text{m}$  нозл и стандартную конфигурацию, рекомендованную производителем. Клетки

сортировали непосредственно в лизирующий буфер RLT (Qiagen) из расчета 350 мкл буфера на 100 000 сортируемых клеток.

После сортировки образцы клеток для продолжительного хранения замораживали в кельвинаторе на -80 °С.

#### **4.3.5. Выделение тотальной РНК**

##### *4.3.5.1. Выделение РНК с помощью TRIzol*

Суспензию клеток (PBMC или образец сортированных Т-клеток) концентрировали в 100 мкл PBS. К клеткам добавляли 900 мкл TRIzol Lysis Reagent (Life Technologies) и тщательно перемешивали. Для эффективного лизиса клетки дополнительно инкубировали 5 мин при комнатной температуре.

Добавляли в образец 200 мкл хлороформа, интенсивно перемешивали, после чего центрифугировали 15 минут при 13000 об/мин и 4 °С. Верхнюю водную фракцию аккуратно отбирали в чистую пробирку и добавляли 500 мкл iPrOH. Центрифугировали 10 минут при 13000 об/мин и 4 °С.

Супернатант отбирали и отбрасывали, осадок РНК промывали в 1 мл 80% EtOH. Центрифугировали 4 минуты при 13000 об/мин и °С.

Супернатант отбирали, осадок РНК высушивали в термостате в течение 5 минут при 37 °С.

РНК растворяли в 20 мкл стерильной, не содержащей РНКаз воды (Qiagen). Концентрацию полученного образца тотальной РНК измеряли на приборе Qubit. Качество выделенной РНК оценивали электрофоретически.

##### *4.3.5.2. Выделение РНК на колонках MinElute*

Препарат тотальной РНК выделяли из размороженных на комнатной температуре образцов наивных Т-клеток с помощью колонок и

соответствующего набора реагентов RNeasy Micro (Qiagen) по протоколу производителя.

Элюцию РНК проводили нанесением 14 мкл стерильной, не содержащей РНКаз воды (Qiagen) в центр мембраны колонки. Выделенный препарат тотальной РНК использовали для приготовления кДНК библиотек генов Т-клеточных рецепторов.

#### **4.3.6. Синтез первой цепи кДНК**

Синтез первых цепей проводили при помощи набора для синтеза кДНК от компании Clontech (США) с использованием обратной транскриптазы SMARTScribe (Clontech) по протоколу, разработанному в нашей лаборатории [107]. В реакции обратной транскрипции использовали весь объем выделенной РНК из отсортированных образцов.

В качестве праймера для синтеза использовали олигонуклеотид BCR4\_short, обладающей специфичностью к обоим константным сегментам  $\beta$  цепи Т-клеточного рецептора (TRBC). Добавляемый в реакцию SMART-адаптер SmartNNA использовался для введения универсальной последовательности на конец синтезируемой молекулы кДНК перед последовательностью сегмента TRBV. Обратная транскриптаза SMARTScribe после завершения синтеза кДНК с матрицы РНК воспринимала последовательность SMART-адаптера как часть матрицы и продолжала синтез первой цепи с последовательности этого адаптера. Данное явление получило название эффект смены матрицы. Кроме того, в последовательность SMART-адаптера был включен молекулярный идентификатор (баркод) – последовательность из 12 случайных “N”-нуклеотидов, необходимых для качественной нормировки и исправления ошибок при биоинформатической обработке результатов секвенирования, а также 6 дезоксиурацилов и 4 рибогуанина (Таблица 1). Дезоксиурацилы при последующей обработке урацил-ДНК-гликозилазой (UDG) использовали, чтобы избавиться от

возможного участия SMART-адаптера в ПЦР-амплификации (см. ниже), а рибогуанины повышали эффективность реакции смены матрицы [108]. Для того, чтобы улучшить сохранность РНК при синтезе первой цепи кДНК, в реакционную смесь также добавляли ингибитор РНКаз rRNasin (Promega). Полный состав реакционной смеси для синтеза кДНК приведен в Таблице 2.

**Таблица 2.** Состав реакционной смеси для синтеза кДНК.

Компонент	Объем, мкл	Конечная концентрация в реакции
Буфер SMARTScribe, Clontech, 5x	4	1x
DTT, Contech, 20 mM	2	2 mM
dNTP, Биосан, 10 mM	2	1 mM
rRNasin, Promega, 40 ед/мкл	1	0,5 ед/мкл
SMARTScribe, Clontech, 100 ед/мкл	2	10 ед/мкл
SmartNNNa, IDT, 20 мкМ	1	1 мкМ
Праймер для синтеза BCR4_short, Евроген, 20 мкМ	1	1 мкМ
РНК	6-7	
Стерильная вода, Qiagen	1-0	

Одна реакция включала в себя 20 мкл реакционной смеси в пробирках на 0,2 мл, и на каждый выделенный образец РНК приходилось по два синтеза в 20 мкл. Реакционную смесь инкубировали 60 минут при 42 °С. После этого в реакции добавляли по 1 мкл UDG для удаления оставшихся молекул адаптера SmartNNNa и инкубировали реакции 40 минут при 37 °С.

После завершения синтеза реакции, соответствующие одному донору, попарно объединяли для каждого образца и проводили очистку кДНК библиотек от компонентов реакционной смеси с помощью набора MinElute PCR purification kit (Qiagen) по протоколу производителя. Элюцию ДНК проводили в 14 мкл буфера EB (Qiagen).

#### 4.3.7. ПЦР-амплификация кДНК библиотек

ПЦР-амплификацию проводили с использованием ДНК-полимеразы HS Q5 (NEB). Амплификацию проводили в два этапа.

##### *Первый раунд ПЦР-амплификации*

В первом раунде ПЦР использовали весь объем синтезированной и затем очищенной на колонках кДНК. В каждую реакцию объемом 50 мкл в пробирках на 0,2 мл добавляли по 14 мкл кДНК библиотеки TCR. В качестве прямого праймера, на 5' конец библиотеки, использовали олигонуклеотид M1ss, комплементарный последовательности адаптера SmartNNNa, а в качестве обратного, на 3' конец амплифицируемой библиотеки, – олигонуклеотид BCuni2, комплементарный обоим вариантам константного сегмента TRBC.

Полный состав реакционной смеси для первого раунда ПЦР-амплификации приведен в Таблице 3.

**Таблица 3.** Состав реакционной смеси для первой ПЦР.

Компонент	Объем, мкл	Конечная концентрация в реакции
Буфер для HS Q5, NEB, 5x	10	1x
dNTP, Биосан, 10 мМ	1	0,2 мМ
HS Q5 ДНК-полимераза, NEB, 2 ед/мкл	0,5	0,02 ед/мкл
Прямой праймер M1ss, Евроген, 10 мкМ	1	0,2 мкМ
Обратный праймер BCuni2, Евроген, 10 мкМ	1	0,2 мкМ
Стерильная вода, Qiagen	22,5	
кДНК	14	

Первую амплификацию проводили на протяжении 21 цикла с предварительным прогревом реакционной смеси на 98 °С в течение двух минут. Использовали следующую программу:

- денатурация – 98 °С, 10 сек
- отжиг – 55 °С, 10 сек
- элонгация – 72 °С, 60 сек

После завершения продукты ПЦР очищали на магнитных частицах AMPure XP по протоколу производителя. Элюцию ДНК с магнитных частиц проводили в 30 мкл буфера EB (Qiagen).

#### *Второй раунд ПЦР-амплификации*

Во втором раунде амплификации использовали по 1 мкл очищенного продукта ПЦР на 25 мкл реакции в пробирках на 0,2 мл.

Для амплификации библиотек со стороны 5' конца использовалась step-out смесь из двух олигонуклеотидов – dir\_read2 и pcr2\_sh\_N700 (Таблица 1). Первый, внутренний, праймер dir\_read2 был комплементарен последовательности M1ss из первой ПЦР и содержал переход на внешний праймер pcr2\_sh\_N700, включающий индекс Illumina. Для амплификации библиотек со стороны константного сегмента TCR аналогичным образом использовали step-out смесь из двух олигонуклеотидов – TCR\_rev\_read1 и pcr2\_sh\_S500 (Таблица 1). Последовательность внутреннего праймера TCR\_rev\_read1 была комплементарна последовательности TRBC и содержала переход на внешний праймер pcr2\_sh\_S500, содержащий необходимый для секвенирования индекс Illumina.

Пробоподготовка библиотек TCR с использованием step-out ПЦР обладала несколькими преимуществами. Во-первых, уменьшилось число неспецифически амплифицированных фрагментов ПЦР, что позитивно отразилось на качестве полученных библиотек. Во-вторых, удалось сократить общее время пробоподготовки, поскольку необходимые для секвенирования



адаптеры Illumina вводились на обоих концах библиотек во время второй амплификации, то есть отпала необходимость лигировать их в отдельной реакции. И в-третьих, используя разные комбинации индексов Illumina N700 и S500, можно было объединять и параллельно секвенировать большое число образцов, не опасаясь перекрестной контаминации на твердой фазе во время секвенирования.

Полный состав реакционной смеси для второго раунда ПЦР-амплификации приведен в таблице 4.

**Таблица 4.** Состав реакционной смеси для второй ПЦР.

Компонент	Объем, мкл	Конечная концентрация в реакции
Буфер для HS Q5, NEB, 5x	5	1x
dNTP, Биосан, 10 мМ	0,5	0,2 мМ
HS Q5 ДНК-полимераза, NEB, 2 ед/мкл	0,25	0,02 ед/мкл
dir_read2, Евроген, 1 мкМ	0,5	0,02 мкМ
pcr2_sh_N700, Евроген, 5 мкМ	1	0,2 мкМ
TCR_rev_read1, Евроген, 1 мкМ	0,5	0,02 мкМ
pcr2_sh_S500, Евроген, 5 мкМ	1	0,2 мкМ
Стерильная вода, Qiagen	22,5	
кДНК	1	

Реакцию проводили в течение 10-16 циклов, в зависимости от стартового количества отсортированных клеток в образце, с предварительным прогревом реакционной смеси на 98 °С в течение двух минут. Использовали следующую программу:

- денатурация – 98 °С, 10 сек
- отжиг – 58 °С, 10 сек
- элонгация – 72 °С, 60 сек

После завершения продукты ПЦР качество полученных библиотек оценивали электрофоретически в 2% агарозном геле по стандартному протоколу. Образцы объединяли и проводили очистку ДНК от компонентов и неспецифических продуктов реакции на магнитных частицах AMPure XP по протоколу производителя. Элюцию ДНК с магнитных частиц проводили в 30 мкл буфера EB (Qiagen).

#### **4.3.8. Секвенирование**

Концентрацию полученной объединенной кДНК библиотеки Т-клеточных рецепторов измеряли с помощью флуориметра Qubit 3.0 (Invitrogen). Секвенирование образцов проводили на приборе Illumina HiSeq 2000/2500 или Illumina NextSeq 550 при двустороннем прочтении в 150 + 150 нуклеотидов.

#### **4.3.9. Анализ результатов секвенирования**

Анализ полученных после секвенирования данных проводили с использованием разработанного коллективом лаборатории специального программного обеспечения – MIGEC[109], MiXCR[110] и VDJTools[111]. Программа MIGEC позволила из полученных данных секвенирования извлечь последовательности, имеющие отношение к Т-клеточным рецепторам, и сгруппировать их по образцам на основании представленных UMI (подробнее см. раздел 5.1.1.).

Софт MiXCR был использован для сборки аминокислотных и нуклеотидных последовательностей CDR3 участка на основании найденных с помощью MIGEC прочтений последовательностей Т-клеточных рецепторов.

Для проведения сравнительного анализа между когортами доноров разного возраста или разными клеточными популяциями, а также для расчета всех необходимых характеристик Т-клеточных репертуаров, таких как средняя длина CDR3 участка, количество добавленных N нуклеотидов, биофизические

характеристики аминокислот участка CDR3, характеристики конкретных TRBV генных семейств и др., проводили с использованием VDJTools.

Для визуализации полученных результатов использовали пакет “ggplot2” в R.

## 5. Результаты и их обсуждение

Данная работа разделена на три части. Первая часть посвящена разработке метода качественного анализа репертуаров Т-клеточных рецепторов, в том числе для небольших количеств (несколько сотен) иммунных клеток. Во второй части рассматриваются изменения, наблюдаемые с возрастом в тотальных TCR $\beta$  репертуарах человека. Третья часть работы посвящена изменениям в структуре наивных CD4 и CD8 Т-клеток для доноров двух возрастных групп с использованием описанного в первой части работы метода.

### 5.1. Разработка качественного метода анализа иммунных репертуаров

На сегодняшний день технологии высокопроизводительного секвенирования нашли широкое применение в исследованиях адаптивного иммунитета в норме и при различных патологиях и дали возможность провести качественный и количественный анализ разнообразия репертуаров Т-клеточных рецепторов [112–115] и антител [116–119] на недоступном до недавнего времени уровне. Благодаря высокой эффективности этих методов исследователям удалось оценить разнообразие иммунных рецепторов как на уровне тотального репертуара [112–115,120–124], так и в контексте различных популяций лимфоцитов: наивных и Т-клеток памяти [120,121,125], субпопуляций CD4<sup>+</sup> Т-клеток [126,127], Ag-специфичных Т-клеток [127] или инфильтрирующих опухоль лимфоцитов [128,129].

Для приготовления библиотек иммунных рецепторов к настоящему моменту были разработаны разнообразные технические подходы, использующие в качестве стартовой материи геномную ДНК [112] или РНК [114] и основанные на мультиплексной ПЦР амплификации переменных генных сегментов или методе RACE (англ. *rapid amplification of cDNA ends*), соответственно. При наличии достаточного количества исходного материала

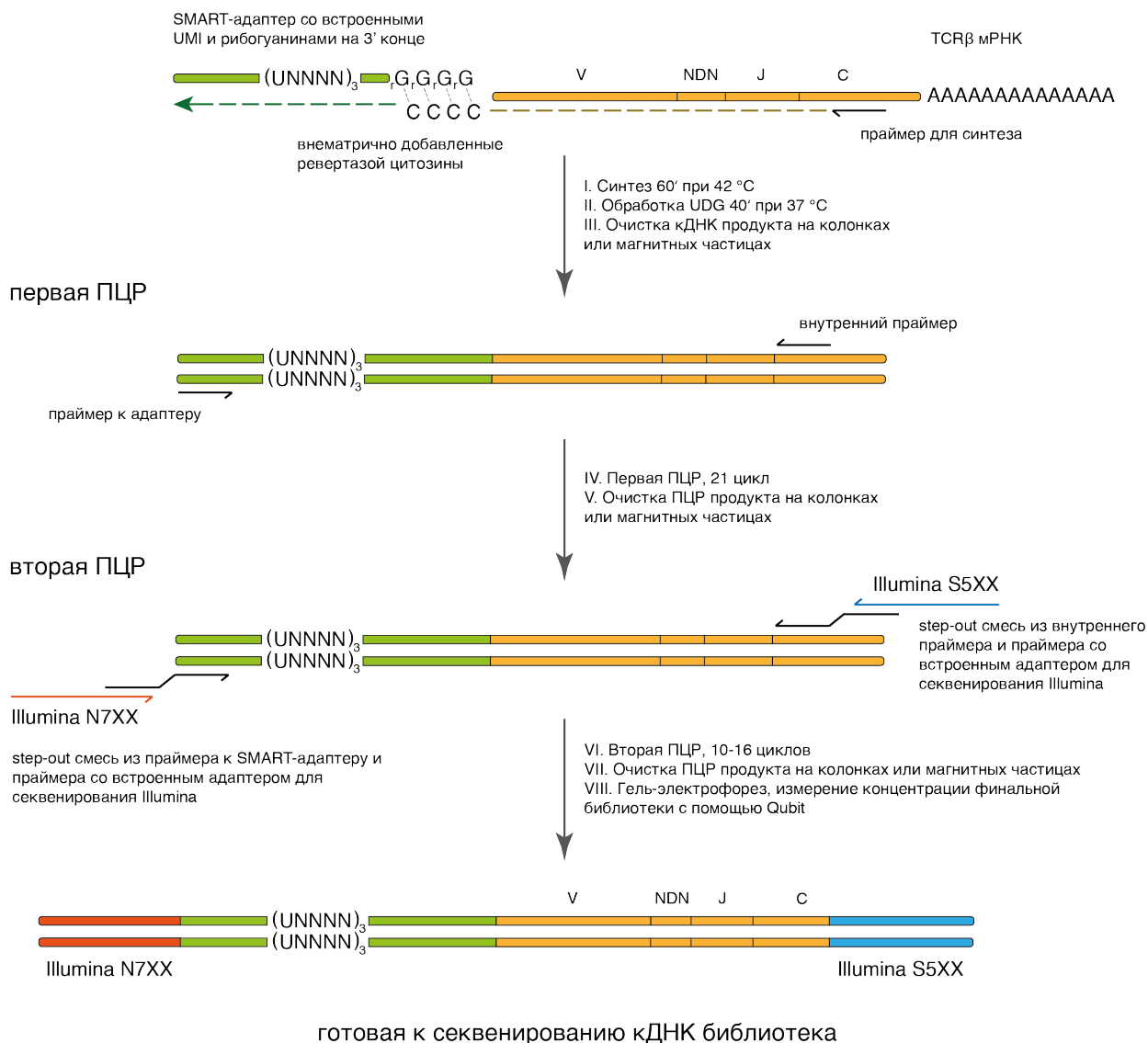
данные методы хорошо себя зарекомендовали. Однако для случаев, когда исследователям приходится иметь дело с небольшим количеством целевых клеток (это может быть редкая популяция отсортированных лимфоцитов или образец ткани, содержащий ограниченное число Т-клеток), подобные подходы имеют ряд серьезных ограничений. На качество анализа начинают отрицательно сказываться искажения, вызванные неравномерной амплификацией генных сегментов, а также ошибки, возникающие в ходе ПЦР-амплификации и секвенирования.

В настоящей работе мы стремились разработать простой и надежный подход, позволяющий анализировать репертуаров иммунных клеток в том числе для экспериментов, когда в качестве исходного материала исследователю доступно от нескольких сотен до тысяч клеток и классические методы приготовления библиотек малоприменимы, поскольку связаны со значительными потерями исходного материала (РНК или ДНК) в процессе приготовления библиотек для высокопроизводительного секвенирования.

### **5.1.1. Анализ репертуаров иммунных клеток на основе UMI**

Разработанный нами метод пробоподготовки кДНК библиотек (Рисунок 4) основывается на технологии 5'-RACE со сменой матрицы (англ. *template switch*) [130], при котором на 3' и 5' концах библиотеки вводятся универсальные сайты отжига праймеров. При таком подходе дальнейшая амплификация вместо сложной мультиплексной смеси праймеров на 5' конце библиотеки проводится с использованием всего двух олигонуклеотидов – комплементарным последовательности введенного адаптера и консервативному участку TCR, соответственно. Это позволяет минимизировать количественные искажения, связанные с разной эффективностью амплификации переменных генных сегментов TCR [114,131]. Также в реакции обратной транскрипции каждая новая

## синтез первой цепи кДНК



**Рисунок 4.** Схема пробоподготовки кДНК библиотеки для секвенирования на платформе Illumina. (UNNNN)<sub>3</sub> – молекулярный баркод (UMI) внутри SMART-адаптера из 12 случайных нуклеотидов, разделенных U в три кассеты из 4 нуклеотидов; Illumina S5XX и Illumina N7XX – последовательности адаптеров для секвенирования (Illumina), встроенные в праймер для второй ПЦР.

синтезированная молекула кДНК маркируется специальной последовательностью – уникальным молекулярным идентификатором (англ. *unique molecular identifier*, UMI) или баркодом, состоящим из 12 встроенных в SMART-адаптер случайных нуклеотидов [52,109,116,132,133].

Такой подход по сравнению с обычными методами приготовления библиотек генов иммунных рецепторов обладает рядом преимуществ.

Во-первых, молекулярное баркодирование UMI позволяет оценить количество молекул, успешно прошедших все стадии синтеза кДНК и амплификации, что крайне важно для качественной нормировки и сравнения данных при анализе результатов секвенирования. Например, из тестового образца, содержащего 1000 Т-клеток, была приготовлена и отсекувенирована кДНК библиотека TCR $\beta$  генов. В зависимости от клональности образца, полученный 1000000 последовательностей секвенирования (ридов) может соответствовать от 1 до 1000 уникальных вариантов Т-клеточных рецепторов. При этом наблюдение, например, 100 уникальных клонотипов среди этого 1000000 ридов не предоставляет надежной информации о глубине выполненного анализа, поскольку эти 100 клонотипов могут содержать разнообразие всей 1000 клеток или только 100 попавших в реакцию лимфоцитов. Наоборот, наблюдение 100 уникальных последовательностей UMI среди этого 1000000 ридов будет четко указывать, что только 100 молекул кДНК (и соответственно не более 100 клеток) прошли анализ. Увеличение глубины секвенирования в таком эксперименте не приведет к улучшению качества анализа (увеличению разнообразия образца).

Во-вторых, анализ на основе UMI устраняет количественные искажения, возникающие из-за неравномерной амплификации разных генных сегментов TCR, а также из-за неоднородной эффективности секвенирования [52,132–134]. Для образцов, содержащих сотни и тысячи клеток и разным распределением клонотипов по частоте, подобные искажения способны привести к серьезному изменению естественного разнообразия. Например, пара идентичных исходных молекул кДНК после амплификации и секвенирования в конечном итоге может быть прочитана 1000 и 100 раз – то есть с разницей на порядок. Тем не менее, после группировки молекул по UMI, 1000 и 100 ридов будут скомпенсированы в две исходные молекулы кДНК. Поэтому подобный подход нормировки результатов секвенирования может

быть эффективно использован для грамотного сравнения двух и более иммунных репертуаров.

В-третьих, использование UMI позволяет эффективно исправлять ошибки ПЦР и секвенирования с применением алгоритмов Safe-Sequencing [132] или Molecular Identifier-Based-Error Error Correction (MIGEC) [109]. Оба алгоритма группируют вместе последовательности, несущие один и тот же баркод, то есть представляющие собой копии одной исходной молекулы ДНК или кДНК. В процессе анализа информация об этих последовательностях усредняется, ошибочно возникшие в ходе амплификации варианты клонотипов отфильтровываются, таким образом устраняется искусственно завышенное разнообразие исходных библиотек (Таблица 6). В качестве дополнительного шага MIGEC может отфильтровывать hot-spot ошибки ПЦР, что необходимо для достижения глубокого безошибочного анализа данных высокопроизводительного секвенирования [109]. В отличие от группировки гомологичных последовательностей секвенирования на основании частот их представленности [135,136], выборочная группировка ридов на основе UMI не приводит к потере истинного разнообразия в образце. Это особенно важно при анализе данных глубокого секвенирования, а также при анализе небольших популяций В-клеток или Т-клеток, где высоко гомологичные варианты могут присутствовать в разных пропорциях, из-за чего их трудно отличить от накопленных ошибок.

Несмотря на очевидные преимущества использования UMI метода существует ряд важных моментов, которые должны быть приняты во внимание при анализе данных. В первую очередь, обсуждаемые выше ПЦР ошибки могут случаться непосредственно внутри последовательности UMI и таким образом способны искусственно увеличивать разнообразие молекулярных баркодов в анализируемой библиотеке. Особенно актуально это становится при большой глубине секвенирования. Так, исходя из результатов наших контрольных экспериментов, стандартный UMI из 12 нуклеотидов в процессе ПЦР амплификации способен произвести до 10-20

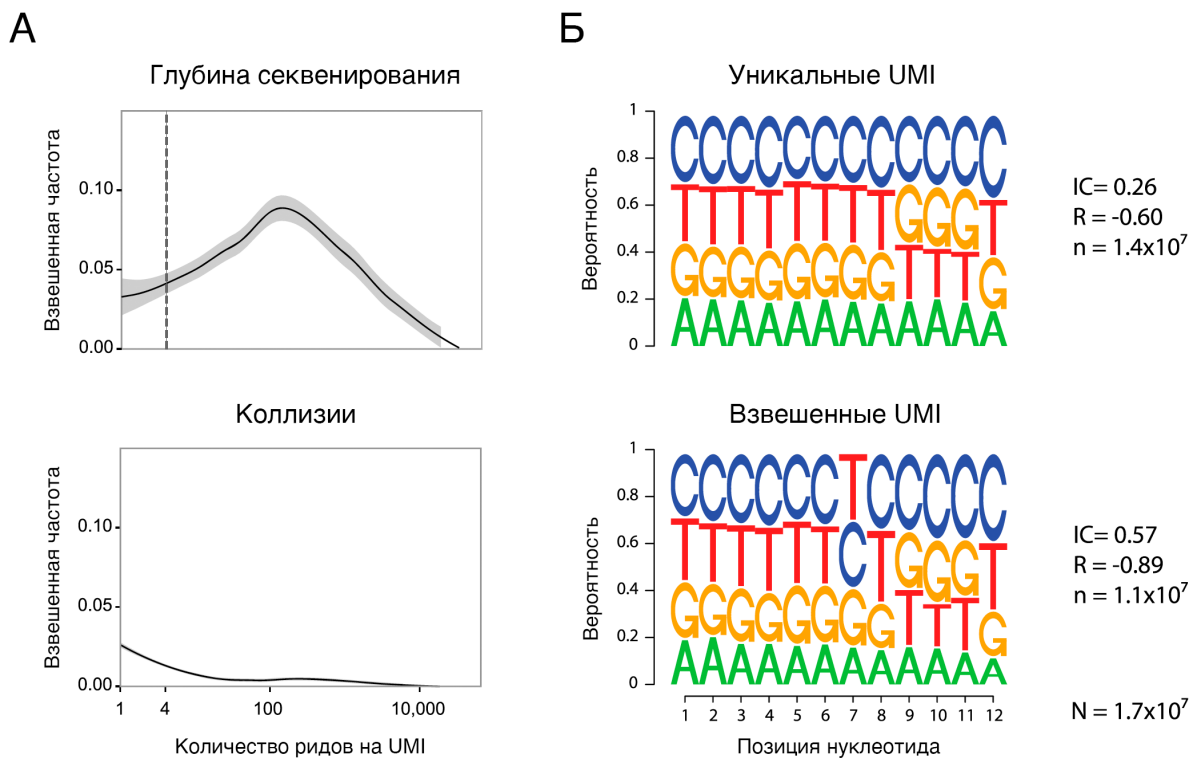


похожих вариантов своей последовательности, которые после секвенирования в совокупности будут представлены 100-200 рядами [109,136,137]. При использовании стандартного метода обработки данных все эти последовательности будут выровнены и усреднены на основании UMI, и на выходе мы получим от 11 до 21 стартовой молекулы кДНК, в то время как на самом деле исходно была синтезирована всего лишь 1. Еще большее число искусственных вариантов было обнаружено в модельной системе с использованием шестнадцати нуклеотидных молекулярных идентификаторов [138].

Оценка количества и частот встречаемости похожих UMI позволяет эффективно очистить данные от подобных искусственных вариантов при достаточной глубине секвенирования. При первичном анализе данных для низкочастотных вариантов UMI, представленных всего 1-2 рядами секвенирования, довольно часто мы находили похожие варианты последовательностей (с одной нуклеотидной заменой) (Рисунок 5.А). Подобная ситуация неоднократно воспроизводилась в контрольных экспериментах с UMI после 27-35 циклов амплификации в процессе пробоподготовки библиотек. Исходя из этого мы пришли к выводу, что основной пул UMI с небольшим покрытием секвенирования представлял собой искусственное разнообразие библиотеки, возникшее в результате ошибок ПЦР на поздних этапах амплификации.

Для того чтобы корректно оценить естественное разнообразие анализируемых библиотек Т-клеточных рецепторов, мы применили двухступенчатую фильтрацию данных. Первым этапом данные секвенирования были зачищены от последовательностей, представляющих собой однонуклеотидные замены высокочастотных вариантов UMI. После чего мы установили порог (Рисунок 5.А) в минимально необходимом количестве рядов, представляющих один уникальный вариант UMI. Подобная процедура позволила отфильтровать данные от оставшихся искусственных вариантов UMI, содержащих две и более нуклеотидные замены. Оптимально

выставленный порог зависит от размера стартовой библиотеки, глубины секвенирования и формы кривой распределения взвешенных частот UMI по



**Рисунок 5. (А)** Ошибки внутри последовательности UMI. Гистограмма распределения частот всех полученных UMI по количеству ассоциированных с ними последовательностей секвенирования, ридов (сверху). И распределение частот UMI с ошибками (снизу). Ошибочными UMI считались те, для которых находился похожий вариант с одной нуклеотидной заменой и не менее чем 10-ти кратной частотой встречаемости. Гистограммы взвешены по количеству представленных ридов на каждый UMI. Порог в 4 рида на UMI показан пунктирной линией на верхнем рисунке. **(Б)** Взвешенная матрица позиций нуклеотидов внутри последовательности UMI SMART-адаптера SmartNNa. Ошибочные варианты UMI были предварительно отфильтрованы, как показано в части А. Разнообразие внутри уникальных UMI (сверху). Каждый UMI был взвешен относительно количества соответствующих ему ридов, чтобы продемонстрировать неравномерность амплификации при пробоподготовке библиотек (снизу).

отношению к количеству последовательной секвенирования на UMI (кривая оверсека). Так, например, для качественного анализа при глубоком

секвенировании необходимо выставлять большую отсечку, для того чтобы удалить из данных значительную часть артефактов.

Еще одно важное замечание касается естественного совпадения последовательностей UMI при их синтезе, которое обозначается термином “коллизии”. Теоретически возможное разнообразие библиотеки для SMART-адаптера с UMI длиной в 12 нуклеотидов ограничивается примерно  $1,7 \cdot 10^7$  уникальных вариантов ( $4^{12}$ ). Поэтому для экспериментов, результаты которых приведены ниже, такие совпадения UMI при общем размере образца в 500–5000 молекул кДНК случались чрезвычайно редко. При этом стоит отметить, в наших экспериментах реальное разнообразие UMI оказалось несколько ниже теоретического и составило порядка  $1,4 \cdot 10^7$  вариантов (Рисунок 5.Б). Это могло быть результатом неравномерного синтеза праймеров и, гипотетически, определенных предпочтений в выборе адаптера при синтезе кДНК и артефактов ПЦР амплификации, поскольку наблюдаемая потеря разнообразия зависела от позиции нуклеотида в UMI и степени его амплификации (Рисунок 5.Б, снизу).

При секвенировании образцов, содержащих большое число стартовых молекул, естественные коллизии для молекулярных идентификаторов длиной в 12 пар нуклеотидов должны происходить значительно чаще. Например, для 1 миллиона исходных молекул можно ожидать до 30000 случайно сгенерированных UMI с полностью совпадающей последовательностью. Поэтому для качественного сравнительного анализа с использованием молекулярных идентификаторов при глубоком секвенировании необходимо помнить о разнообразии образца и рекомендуется использовать последовательности UMI с большим разнообразием. В противном случае большое число коллизий может привести к сокращению естественного разнообразия библиотеки и ухудшению качества проведенного анализа.

### 5.1.2. Разработка метода пробоподготовки кДНК библиотек для небольшого числа Т-клеток

Нами был значительно улучшен и оптимизирован имеющийся протокол пробоподготовки кДНК библиотек генов Т-клеточных рецепторов человека [108]. Так, было подобрано оптимальное соотношение стартового материала и объема реакции. При новом подходе весь объем выделенной РНК шёл в реакцию обратной транскрипции, и вся синтезированная кДНК использовалась в ПЦР. При этом дополнительная стадия очистки кДНК после обратной транскрипции позволила значительно сократить объем последующей амплификации.

При работе с малыми количествами клеток, чтобы избежать потерь материи в ходе пробоподготовки, мы проводили синтез кДНК непосредственно с клеток, которые лизировали при определенных условиях. Для разрушения клеточной мембраны мы использовали несколько разных техник: кратковременно замораживали на  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  или проводили серию кратковременных нагревов до  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  клеточной суспензии, а также инкубировали клетки вместе с детергентом Tween 20. Все эти методики позволили нам стабильно и с хорошей воспроизводимостью получать кДНК библиотеки TCR после 30-36 циклов ПЦР амплификации, имея на старте лишь 1000 РВМС (около 500 Т-клеток). Примечательно, что для приготовления библиотек сопоставимого качества для Т-клеток при выделении РНК с помощью TRIzol (Invitrogen) необходимо было иметь на старте в несколько раз большее число клеток. Эффективность разработанного метода была подтверждена в серии контрольных экспериментов, а также при исследовании разнообразия популяции CD4 Т-клеток внутри кишечника плода человека при эмбриональном развитии.

#### *Эксперимент 1: восемь реплик по 4000 РВМС*

В первом модельном эксперименте мы подготовили и секвенировали кДНК библиотеки  $\alpha$  и  $\beta$  цепей Т-клеточных рецепторов, полученные из 8

равных реплик по 4000 РВМС (~2000 Т-клеток) одного взрослого здорового донора. Пробоподготовку библиотек проводили согласно описанному в разделе “Материалы и методы” протоколу, после чего библиотеки объединяли в равных пропорциях и секвенировали на платформе Illumina MiSeq. При первичном биоинформатическом анализе без учета UMI с использованием программного обеспечения MiTCR [137] было идентифицировано от 61860 до 702195 CDR3-содержащих последовательностей TCR (Таблица 5).

**Таблица 5.** Анализ разнообразия репертуаров TCR для эксперимента с 8 репликами по 4000 РВМС (~2000 Т-клеток).

Название реплики	Количество CDR3 содержащих ридов, MiTCR	Количество использованных ридов с помощью MiGEC* (%)	Количество проанализированных молекул кДНК, MiGEC*	Количество уникальных клонотипов, MiGEC*
TCR $\beta$ 1	344 740	303 121 (87,93%)	1 944	882
TCR $\beta$ 2	351 908	294 307 (83,63%)	1 520	690
TCR $\beta$ 3	575 639	475 617 (82,62%)	3 473	1 414
TCR $\beta$ 4	617 786	481 992 (78,02%)	6 395	2 558
TCR $\beta$ 5	614 788	521 669 (84,85%)	3 077	1 285
TCR $\beta$ 6	574 116	493 165 (85,90%)	2 564	1 098
TCR $\beta$ 7	702 195	576 752 (82,14%)	4 296	1 860
TCR $\beta$ 8	652 733	523 044 (80,13%)	3154	1 410
TCR $\alpha$ 1	61 860	56 625 (91,54%)	658	349
TCR $\alpha$ 2	81 391	75 540 (92,81%)	489	276
TCR $\alpha$ 3	118 577	111 420 (93,96%)	1060	542
TCR $\alpha$ 4	218 138	182 907 (83,85%)	1830	812
TCR $\alpha$ 5	109 766	93 269 (84,97%)	1147	505
TCR $\alpha$ 6	85 013	71 730 (84,38%)	888	404
TCR $\alpha$ 7	112 672	93 301 (82,81%)	1246	583
TCR $\alpha$ 8	66 042	52 012 (78,76%)	965	463

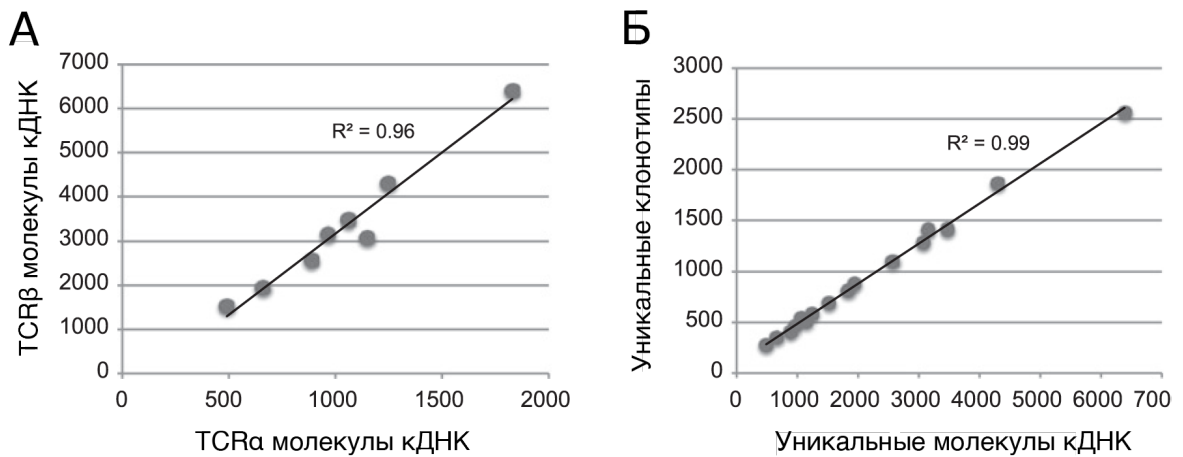
\*Учтены только функциональные варианты TCR, каждая кДНК молекула представлена не менее чем 4 прочтениями последовательности CDR3

При анализе с помощью MIGES [109] прочтения последовательностей секвенирования с одинаковыми молекулярными идентификаторами и, следовательно, представляющие одну и ту же исходную молекулу кДНК, были сгруппированы. Артефакты и искусственные UMI были отфильтрованы в соответствии с логикой, описанной выше в разделе 5.1. Анализ распределения UMI по количеству ридов секвенирования показал, что порог в четыре прочтения на молекулярный идентификатор был оптимальным для отбора большинства CDR3-содержащих последовательностей и для удаления большинства ошибок и артефактов, представленных низким покрытием секвенирования. Следовательно, только те UMI, которые были независимо отсеквенированы четыре раза и более, использовались в дальнейшем анализе (Рисунок 5.A). В качестве последнего шага мы отфильтровали варианты CDR3, содержащие стоп-кодон или находящиеся вне рамки считывания, для анализа исключительно функционального разнообразия Т-клеточных рецепторов.

В результате было выявлено от 1520 до 6395 молекул кДНК на реплику для библиотек TCR $\beta$  ( $3302 \pm 1522$ ) и от 489 до 1830 молекул на реплику для библиотек TCR $\alpha$  ( $1035 \pm 406$ ) (Таблица 5).

Таким образом, на каждую из 2000 Т-клеток в среднем на реплику было проанализировано по 1,7 TCR $\beta$  и 0,5 TCR $\alpha$  молекул мРНК, вошедших в реакцию синтеза кДНК. Подобная чувствительность хорошо согласовывалась с результатами прошлых экспериментов [108] и, вероятно, была ограничена эффективностью реакции при синтезе кДНК. Количество полученных молекул кДНК TCR $\alpha$  и TCR $\beta$  точно коррелировало между репликами ( $R^2 = 0,96$ , Рисунок 6.A), что указывает на неравное число клеток, попавших в каждую реакцию, при высокой воспроизводимости метода. Количество отобранных Т-клеток определило глубину анализа. Разнообразие последовательностей CDR3, то есть число уникальных клонотипов Т-клеток, составило от 690 до 2558 вариантов для TCR $\beta$  и от 276 до 812 вариантов для TCR $\alpha$  библиотек на

реплику (Таблица 5) и коррелировало с количеством анализируемых молекул кДНК (Рисунок 6.Б).



**Рисунок 6.** (А) Соотношение полученных TCR $\alpha$  и TCR $\beta$  молекул между репликами и (Б) корреляция между количеством кДНК молекул и числом уникальных клонотипов для каждой реплики (совместно для TCR $\alpha$  и TCR $\beta$  цепей).

Отдельно стоит отметить, что при стандартном анализе, когда коррекция ошибок ПЦР проводилась без учета UMI и только на основании распределения частот похожих клонотипов, для всех реплик было получено несколько более высокое разнообразие репертуаров TCR $\alpha$  и TCR $\beta$  библиотек. Однако при более детальном рассмотрении выяснилось, что многие дополнительные варианты Т-клеточных рецепторов, которые не попали в анализ с использованием UMI, представляли собой некомпенсированные искусственные варианты последовательностей CDR3 (Таблица 6). Данное наблюдение было вполне ожидаемым, поскольку известно, что при глубоком секвенировании малого числа молекул происходит значительное накопление и преобладание разнообразия накопленных ошибок над разнообразием реального репертуара. Однако анализ на основе UMI позволил успешно использовать более 85% CDR3-содержащих прочтений секвенирования (Таблица 5). Проведя глубокое секвенирование полученных реплик, мы удостоверились, что извлекли информацию о большинстве молекул кДНК,

**Таблица 6.** Нуклеотидные замены, возникающие в ходе амплификации и секвенирования (выделены серым фоном), могут быть обнаружены и устранены с помощью анализа на основании UMI.

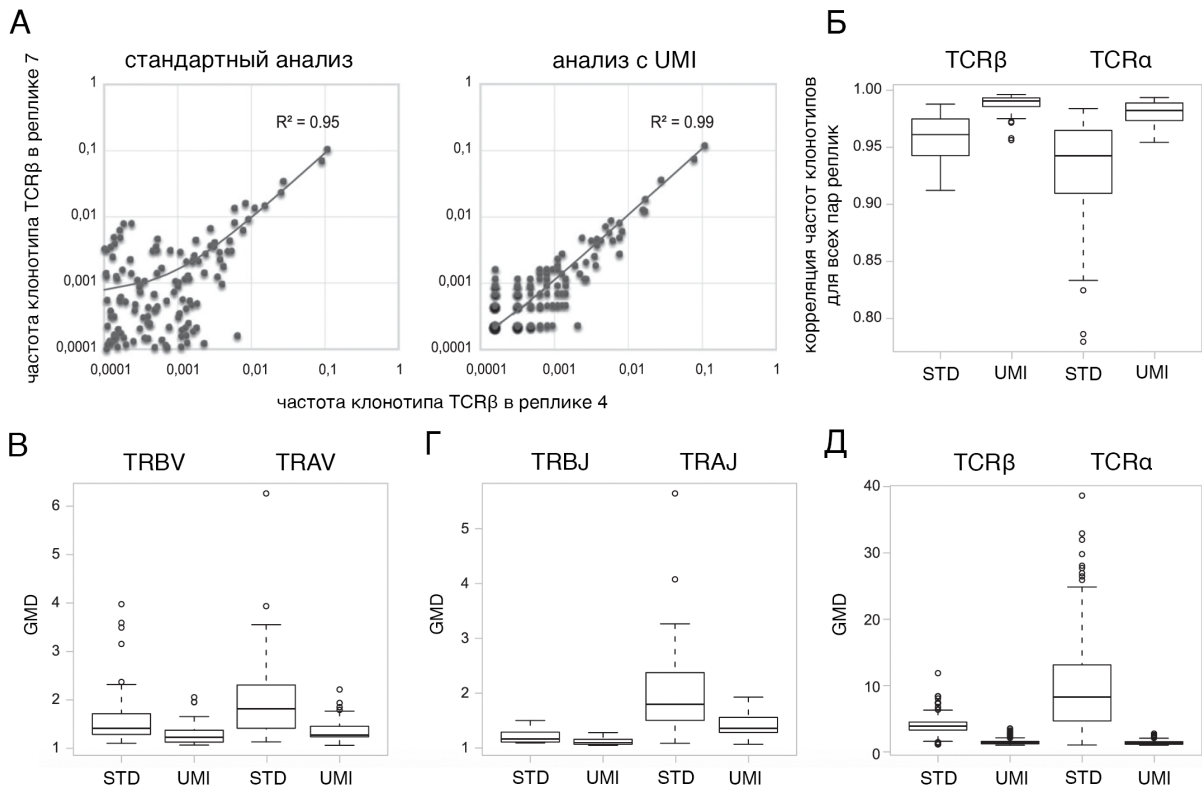
Нуклеотидная последовательность CDR3	Аминокислотная последовательность CDR3 участка	Стандартный анализ, кол-во ридов	Анализ с UMI, молекул кДНК (кол-во ридов использовано)
Основной CMV-HLA*A02-NLV специфичный TCRβ клонотип			
TGTGCCAGCAGCTTAGCGCCGGGAGCAACTAATGAAAACTGTTTTT	CASSLAPGATNEKLFF	7,917	55 (7,235)
TGTGCCAGCGGCTTAGCGCCGGGAGCAACTAATGAAAACTGTTTTT	CASGLAPGATNEKLFF	4	-
TGTACCAGCAGCTTAGCGCCGGGAGCAACTAATGAAAACTGTTTTT	CTSSLAPGATNGKLFF	2	-
TGTGCCAGCAGCTTAGCGCCGGGAGCACTAATGAAAACTGTTTTT	CASSLAPGAANEKPF	2	-
TGTACCAGCAGCTTAGCGCCGGGAGCAACTAATGAAAACTGTTTTT	CTSSLAPGATNEKLLF	1	-
TGTACCAGCAGCTTAGCGCCGGGGCAACTAGTGAAAACTGTTTTT	CTSSLAPGATSEKLFF	1	-
TGTGCCAGCAGCTTAGCGCCGAGAGCAACTAATGAAGAACTGTTTTT	CASSLAPRATNEELFF	1	-
TGTGCCAGCAGCTTAGCGCCGGGAGCAACTAATGAAAACTGTTTTT	CASSLAPGATNEKLVF	1	-
TGTGCCAGCAGCTTAGCGCCGGGAGCAACTAATGAAGAACTGTTTTT	CASSLAPGATNEELFF	1	-
TGTGCCAGCAGCTTAGCGCCGGGATCAACTAATGAAGAACTGTTTTT	CASSLAPGSTNEELFF	1	-
TGTGCCAGCGGCTTAGCGCCGGGAGCAACTGATGAAAACTGTTTTT	CASGLAPGATDEKLFF	1	-
Минорный CMV-HLA*A02-NLV специфичный TCRβ клонотип			
TGTGCCAGCAGCTTAGCGCCCGGGCAACTAATGAAAACTGTTTTT	CASSLAPGATNEKLFF	201	1 (184)
TGTGCCAGCAGCTTAGCGCCCGGGCAACTAACAAAACTGTTTTT	CASSLAPGATNKLFF	1	-

прошедших реакцию обратной транскрипции, и получили репрезентативные данные о составе образца, не содержащие ошибок и артефактов секвенирования.

Сравнение двух подходов анализа данных показало, что учет UMI существенно улучшает количественную оценку клонотипов и генных сегментов. Частоты идентифицированных клонотипов лучше коррелировали при сравнении парных реплик в методе молекулярного баркодирования по сравнению со стандартным способом анализа данных (Рисунок 7.А-Б). Использование UMI также позволило получить более точные частоты использования сегментов TCR с минимальным разбросом между репликами (Рисунок 7.В-Г). Чтобы определить воспроизводимую чувствительность анализа, мы нанесли на график количество реплик, в которых был обнаружен CDR3 клонотип, в сравнении с его средней концентрацией (Рисунок 8). Этот анализ выявил, что CDR3 TCRα и TCRβ клонотипы со средней концентрацией 0,3% (то есть, в среднем представленные приблизительно от пяти до семи



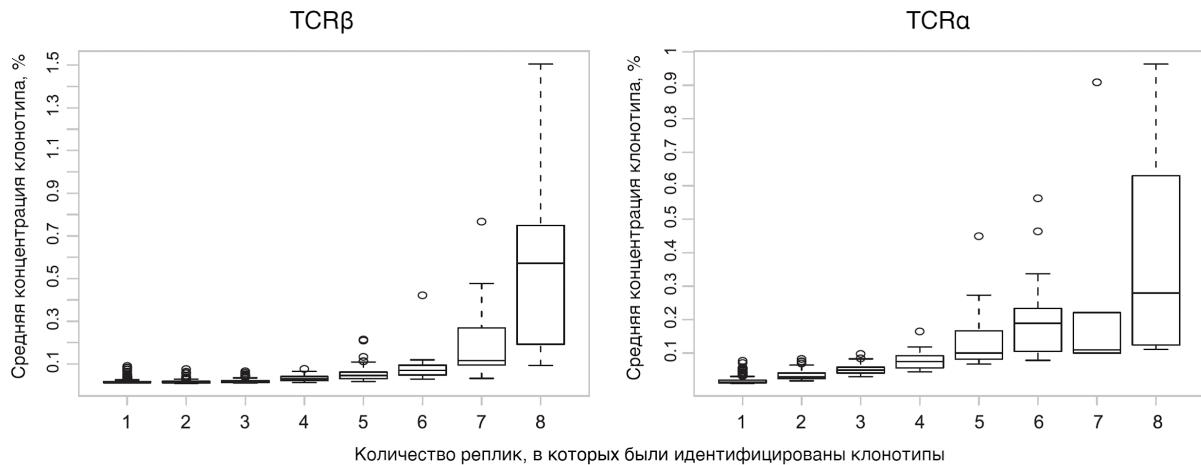
Т-клеток) обычно идентифицировали во всех восьми репликах. Физическая вероятность неудачного отбора клонотипа в восьми из восьми образцов для клонотипа, представленного тремя Т-клетками, в этом случае составила 33%, что указывает на то, что мы вплотную приблизились к пределу выборки.



**Рисунок 7.** Сравнение эффективности стандартного метода анализа иммунных репертуаров и метода на основе UMI. **(А)** Корреляция частот CDR3 TCRβ клонотипов между двумя репликами при стандартном анализе и анализе с применением UMI. **(Б)** Корреляция частот CDR3 TCRα и TCRβ клонотипов между парами всех 8 реплик. Дисперсия частот V- **(В)** и J-генных сегментов **(Г)** для CDR3 TCRα и TCRβ клонотипов для 8 биологических реплик. Частота для каждого генного сегмента была рассчитана как сумма частот клонотипов, содержащих этот генный сегмент в последовательности CDR3. **(Д)** Дисперсия частот для клонотипов, идентифицированных во всех 8 репликах. UMI – метод обработки данных с использованием молекулярных баркодов, STD – стандартный метод (без учета UMI), GMD – геометрическое стандартное отклонение.

В стандартном анализе данных относительная концентрация основных клонотипов была идентифицирована с заметной дисперсией, тогда как подсчет

молекул кДНК с помощью UMI дал значительно более воспроизводимые данные о концентрации каждого клонотипа (Рисунок 7.Д). Соответственно, данные UMI-анализа показали более высокую стабильность между репликами для наиболее широко представленных клонотипов (Таблица 7).



**Рисунок 8.** Чувствительность и воспроизводимость метода с UMI. Показано присутствие TCR $\alpha$  и TCR $\beta$  клонотипов в 8 репликах для 4000 РВМС в зависимости от их средней концентрации. Клонотипы с концентрацией  $>0,3\%$  были идентифицированы во всех 8 репликах.

Для нескольких крупных и стабильных клонов Т-клеток этого донора ранее нами были идентифицированы  $\alpha$  и  $\beta$  цепи функциональных TCR [139]. Используя эту информацию, мы проверили, насколько точной может быть попытка предсказать нативные пары  $\alpha$  и  $\beta$  цепей Т-клеточных рецепторов на основании ранга клонотипов для небольших количеств клеток. Как показано на рисунке 9, пары  $\alpha$  и  $\beta$  цепей TCR могут быть однозначно идентифицированы для крупных верхних клонов в сложной смеси Т-клеток периферической крови. Это означает, что для небольших образцов клеток, какой может быть, например отсортированная популяция антиген-специфичных Т-клеток, выделенная с помощью иммунофенотипирования МНС-мультимерами (тетра- или декстрамерами), возможна простая идентификация нативных пар  $\alpha\beta$  TCR при анализе данных на основе UMI.

**Таблица 7.** Порядок и концентрация для 10 наиболее крупных клонотипов в эксперименте с 8 репликами по 4000 РВМС. Анализ данных на основе UMI демонстрирует более воспроизводимую картину между репликами.

Аминокислотная последовательность CDR3 TCR $\beta$	Средняя концентрация клонотипа, %	Геометрическое отклонение	Ранг клонотипа (отображён соответствующим цветом) и его концентрация (значение) в технических репликах							
			1	2	3	4	5	6	7	8

#### Стандартный анализ

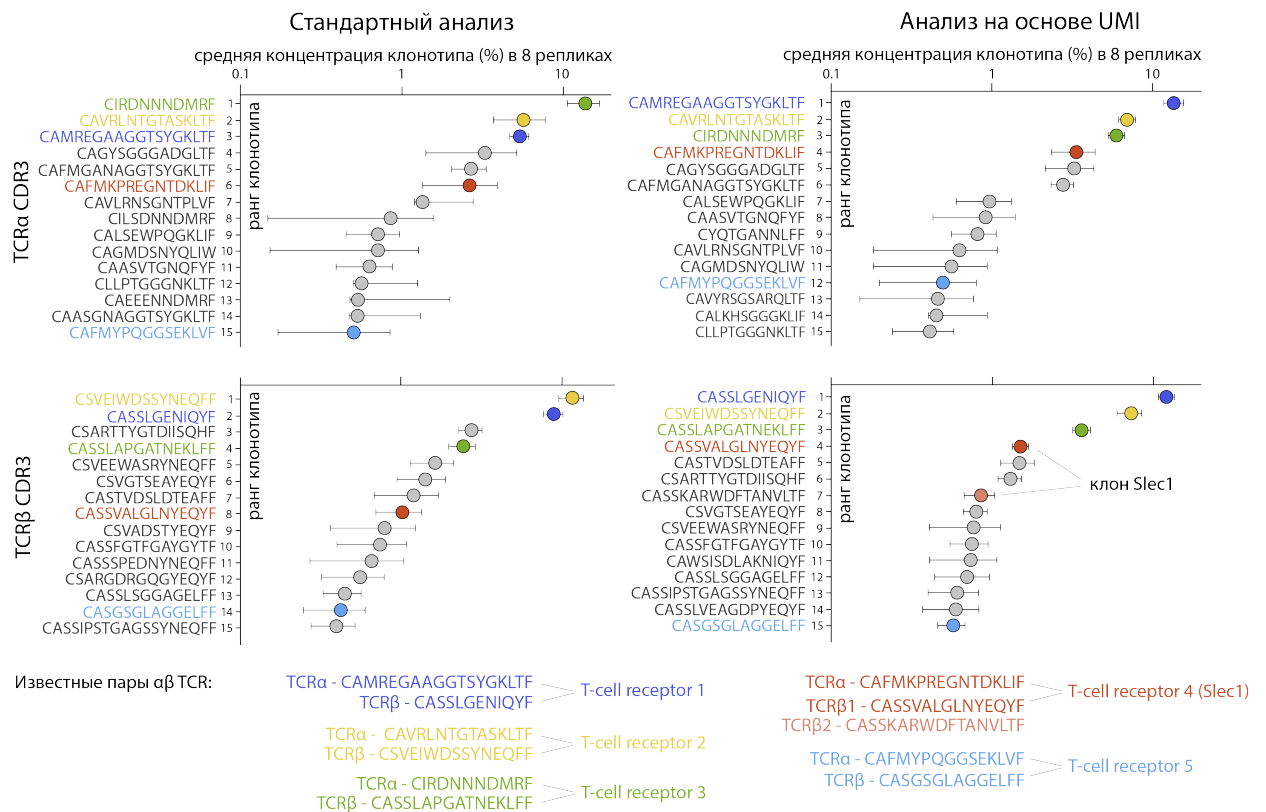
CSVEIWDSSYNEQFF	11.49	1.2	13.6	11.4	9.7	10.6	11.5	15.3	10.6	9.5
CASSLGENIQYF	8.73	1.1	10.3	9.1	9.4	9.0	9.6	7.5	7.1	7.6
CSARTTYGTDIISQHF	2.69	1.2	2.6	2.5	2.9	2.7	2.9	2.1	3.5	3.2
CASSLAPGATNEKLFF	2.39	1.2	2.4	2.5	2.6	2.5	2.4	2.1	2.4	2.1
CSVEEWASRYNEQFF	1.61	1.4	1.7	2.5	1.6	1.5	2.0	2.0	1.6	1.8
CSVGTSEAYEQYF	1.39	1.4	1.4	2.2	1.4	1.1	1.8	1.6	1.5	1.2
CASTVDSLDEAFF	1.18	1.6	1.2	2.2	1.0	0.9	1.5	1.4	1.4	1.1
CASSVALGLNQEYF	1.00	1.5	1.2	2.0	1.0	0.8	1.2	1.4	1.4	1.1
CSVADSTYEYF	0.78	2.0	1.1	1.2	0.9	0.8	1.1	1.2	0.9	1.1
CASSFGTFGAYGYTF	0.73	1.6	1.1	1.1	0.9	0.6	1.0	1.0	0.8	0.9

#### Анализ на основе UMI

CASSLGENIQYF	12.21	1.1	11.4	13.5	13.4	10.6	12.0	12.5	12.0	12.2
CSVEIWDSSYNEQFF	7.29	1.2	7.0	8.3	4.8	7.6	7.3	9.1	7.4	6.6
CASSLAPGATNEKLFF	3.65	1.1	4.2	3.6	3.7	2.7	4.2	3.6	3.6	3.6
CASSVALGLNQEYF	1.51	1.1	1.6	1.5	1.6	1.7	1.9	1.6	1.9	1.5
CASTVDSLDEAFF	1.48	1.3	1.5	1.3	1.6	1.6	1.6	1.1	1.3	1.3
CSARTTYGTDIISQHF	1.30	1.2	1.5	1.1	1.5	1.5	1.3	1.1	1.2	1.0
CASSKARWDFANVLTFF	0.85	1.2	1.2	1.1	1.1	0.8	0.9	1.1	0.9	1.0
CSVGTSEAYEQYF	0.80	1.2	1.1	1.0	0.9	0.8	0.9	1.1	0.8	1.0
CSVEEWASRYNEQFF	0.77	1.3	1.0	0.9	0.8	0.8	0.9	0.9	0.7	0.9
CASSFGTFGAYGYTF	0.75	1.3	0.8	0.9	0.7	0.8	0.8	0.9	0.6	0.9

Напротив, при стандартном анализе без использования молекулярных идентификаторов для известных клонотипов были получены плохо согласующиеся данные, не позволяющие надежно идентифицировать нативные пары  $\alpha$  и  $\beta$  цепей T-клеточных рецепторов (Рисунок 9).

В наших предыдущих работах было показано, что в субпопуляции CD3<sup>+</sup>TRBV9<sup>low</sup> клеток для этого человека присутствует клон T-клеток, Slec1, занимающий практически все TRBV9 семейство, и который легко может быть



**Рисунок 9.** Поиск нативных пар  $\alpha$  и  $\beta$  цепей TCR с помощью ранжирования наиболее крупных клонотипов при стандартном и UMI анализе. Показаны по 15 наиболее крупных клонов для  $\alpha$  и  $\beta$  цепей T-клеточных рецепторов после стандартной обработки данных (слева) и анализа на основе UMI (справа). Известные  $\alpha\beta$  пары функциональных TCR [139] показаны индивидуальным цветом.

визуализирован с помощью проточной цитометрии [140]. Данный клон Slec1 представлен одной функциональной  $\alpha$ -цепью (аминокислотная последовательность CDR3: CAFMKPREGNTDKLTFF; TRAV38-1/TRAJ34), одной функциональной  $\beta$ -цепью (аминокислотная последовательность CDR3: CASSVALGLNLYEQYFF; TRBV9/TRBJ2-7) и одной нефункциональной, но экспрессирующейся  $\beta$ -цепью TCR (аминокислотная последовательность CDR3: CASSKARWDFDTANVLTFF; TRBV21-1/TRBJ2-6) [140]. Согласно данным проточной цитометрии, Slec1 на момент анализа составлял 2,5% от всех T-клеток периферической крови у этого донора. Анализ результатов секвенирования с использованием UMI показал, что последовательности CDR3 региона клона Slec1 составляли  $2,4 \pm 0,2\%$  в TCR $\beta$  библиотеках (обе экспрессированные TCR $\beta$  мРНК этого клона) и  $3,4 \pm 1\%$  в библиотеках TCR $\alpha$ ,

что хорошо согласуется с ранее полученными данными проточной цитометрии. При стандартном анализе эти значения составили  $1,3 \pm 0,3\%$  для последовательностей TCR $\beta$  и  $2,6 \pm 1,3\%$  для последовательностей TCR $\alpha$ , демонстрируя значительно более слабую корреляцию как между собой, так и с данными проточной цитометрии.

*Эксперимент 2. Сортированная субпопуляция TRBV9<sup>low</sup>, по 500 T-клеток в 8 репликах*

В следующем эксперименте мы решили удостовериться, насколько разработанный метод применим для работы с небольшими клеточными популяциями. С помощью FACS была выделена и отсортирована TRBV9<sup>low</sup> субпопуляция CD3<sup>+</sup> T-клеток донора из первого эксперимента. Сортировку проводили в 350 мкл 120 mM KCl, после чего клетки концентрировали и разделили на 8 равных реплик приблизительно по 500 T-клеток в каждой. Клетки разрушали с помощью серии кратковременных нагревов до 50 °C и последующего охлаждения до 20 °C, синтез кДНК, пробоподготовку и секвенирование библиотек проводили согласно описанному в “Материалах и методах” протоколу.

Как мы и ожидали, значительную часть репертуара (от 85 до 97%, в зависимости от реплики) занимал единственный клон Slec1, и две его TCR $\beta$  цепи были представлены в равных пропорциях. Интересно, что в трех репликах был обнаружен в незначительном количестве новый TCR $\alpha$  клонотип CAFVGGPQGGSEKLVF (TRAV38-1/TRAJ57). Для этих же трех реплик с сопоставимо низкой частотой также был идентифицирован TCR $\beta$  клонотип CASSVETGDLAFETQYF (TRBV9/TRBJ2-5), что позволяет предположить, что обе эти последовательности TCR представляют собой один клон T-клеток с TRBV9<sup>low</sup> фенотипом. Данный пример еще раз демонстрирует возможность идентификации нативных  $\alpha\beta$  пар TCR на основании их встречаемости с сопоставимой частотой в одних и тех же небольших репликах.

Хотя воспроизводимость между репликами была достаточно высокой, общее число детектируемых молекул кДНК на приблизительно 500 отсортированных TRBV9<sup>low</sup> T-клеток для каждой реплики как для  $\alpha$ , так и для  $\beta$  цепи было значительно ниже, чем в первом эксперименте. Для каждой реплики после биоинформатического анализа с использованием UMI в среднем было идентифицировано по 50 молекул для TCR $\alpha$  и 120 молекул кДНК для TCR $\beta$ . По нашим предположениям такой низкий выход мог быть связан с деградацией части РНК при сортировке клеток или с потерей части клеток при концентрировании и переносе клеточной суспензии в разные буферы.

### *Эксперимент 3. Отсортированные CD8 T-клетки памяти в репликах по 500 и 1000 клеток*

Поскольку небольшое количество детектируемых молекул кДНК во втором эксперименте скорее всего было связано с потерей части клеток после сортировки при концентрировании суспензии и переносе клеток из одного буфера в другой, в следующем эксперименте мы провели сортировку T-клеток непосредственно в 20 мкл буфера для обратной транскрипции. Для лизиса клеток в буфер для синтеза кДНК был добавлен 0,05% (конечная концентрация) Tween 20. По результатам наших предыдущих экспериментов было установлено, что используемый детергент в подобной концентрации эффективно разрушает клеточную мембрану и не оказывает негативного влияния на обратную транскрипцию. Кроме того, буфер для реакции также содержал ингибитор РНКаз rRNAsin (Promega), чтобы обеспечить необходимую сохранность материала при процедурах пробоподготовки и предотвратить деградацию РНК. Мы отсортировали по 500 и 1000 CD8<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> T-клеток памяти в 4 репликах каждая. После этого к образцам были добавлены праймеры для синтеза кДНК  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей T-клеточных рецепторов, SMART-адаптер и обратная транскриптаза SMARTScribe. Все последующие процедуры пробоподготовки и секвенирования библиотек проводили согласно

описанному в “Материалах и методах” протоколу. Результаты анализа приведены в Таблице 8.

Воспроизводимость между биологическими репликами с точки зрения количества полученных событий кДНК оказалась высокой. Мы получили 171 ( $\pm 34$ ) и 522 ( $\pm 61$ ) кДНК молекул на 1000 отсортированных Т-клеток для TCR $\alpha$  и TCR $\beta$  библиотек, соответственно. Аналогично на 500 отсортированных Т-клеток мы получили 92 ( $\pm 18$ ) и 278 ( $\pm 18$ ) кДНК молекул для TCR $\alpha$  и TCR $\beta$  библиотек, соответственно (Таблица 8). В пересчете на количество проанализированных кДНК молекул на клетку для 8 реплик это составило 0,17 ( $\pm 0,03$ ) TCR $\alpha$  и 0,54 ( $\pm 0,05$ ) TCR $\beta$  молекулы кДНК. Таким образом, непосредственная сортировка клеток в буфер для синтеза кДНК и отсутствие дополнительных стадий концентрирования клеточных суспензий и выделения РНК позволили увеличить выход реакции. В экспериментах для 500 и 1000 клеток в каждой из четырех реплик были идентифицированы клонотипы TCR $\beta$ , представленные в среднем не менее пяти клетками. Для TCR $\alpha$  этот порог оказался несколько выше и составил, по меньшей мере, 15 Т-клеток для каждой реплики.

**Таблица 8.** Анализ разнообразия репертуаров TCR для сортированных реплик 500 и 1000 Т-клеток памяти.

Название реплики	Т-клеток отсортировано	Количество CDR3 содержащих ридов, MiTCR	Количество использованных ридов с помощью MIGEC* (%)	Количество проанализированных молекул кДНК, MIGEC*	Количество уникальных клонотипов, MIGEC*
TCR $\beta$ 1	1000	180 630	166 889 (92,4)	440	70
TCR $\beta$ 2	1000	1 087 649	1 049 782 (96,5)	583	81
TCR $\beta$ 3	1000	1 911 724	1 846 015 (96,6)	550	78
TCR $\beta$ 4	1000	1 292 448	1 246 884 (96,5)	513	86
TCR $\beta$ 5	500	417 645	395 759 (94,8)	262	46
TCR $\beta$ 6	500	669 493	643 004 (96)	279	50
TCR $\beta$ 7	500	194 914	183 315 (94)	260	50
TCR $\beta$ 8	500	1 414 272	1 327 419 (93,9)	300	49
TCR $\alpha$ 1	1000	259 257	225 466 (87)	122	39
TCR $\alpha$ 2	1000	212 934	202 727 (95,2)	193	51
TCR $\alpha$ 3	1000	644 902	615 095 (95,4)	196	52
TCR $\alpha$ 4	1000	379 840	360 776 (95)	172	47
TCR $\alpha$ 5	500	71 162	67 176 (94,4)	87	29
TCR $\alpha$ 6	500	469 045	427 413 (91,1)	108	27
TCR $\alpha$ 7	500	87 607	82 075 (93,7)	82	26
TCR $\alpha$ 8	500	193 983	157 914 (81,4)	63	17

\*Учтены только функциональные варианты TCR, каждая кДНК молекула представлена не менее чем 5 последовательностями секвенирования



### 5.1.3. Эффективность метода при глубоком секвенировании иммунных репертуаров

Следующим этапом нашей работы стала оценка эффективности разработанного метода при глубоком секвенировании иммунных репертуаров. Для этого мы проанализировали тотальные репертуары Т-клеточных рецепторов двух взрослых здоровых доноров (Таблица 9, доноры 1 и 2). Для первого донора замороженный образец РВМС был разделен на две неравные части, из которых по протоколу, описанному в “Материалах и методах”, были приготовлены и отсеквенированы кДНК библиотеки  $\beta$ -цепей Т-клеточных рецепторов. Библиотеки второго донора были аналогичным образом приготовлены и отсеквенированы из двух неравных образцов РВМС.

Образцы содержали значительное количество клеток (несколько миллионов РВМС), поэтому не было необходимости проводить прямой синтез кДНК с клеток из-за возможных потерь материи в ходе пробоподготовки. Наоборот, исходя из результатов наших тестовых экспериментов, мы установили, что присутствие большого количества клеток в реакционной смеси было способно значительно снизить эффективность обратной транскрипции. Скорее всего данный эффект был связан с разрушением РНК собственными РНКазами клетки и ингибированием ревертазы клеточными компонентами после лизиса мембран клетки. Поэтому для этого эксперимента РНК была выделена с помощью TRIzol (см. раздел “Материалы и методы”, п. 4.3.5.1.). Из имеющихся на старте 3-10 миллионов РВМС после всех процедур пробоподготовки и секвенирования для каждого образца было получено от 1 до 2,6 миллионов уникальных молекул кДНК TCR $\beta$ , которые включали от 400 000 до 600 000 различных клонотипов (Таблица 9, доноры 1 и 2). Анализ данных на основе UMI проводился с помощью MIGES по логике, описанной в п. 5.1. Сравнение частот всех пересекающихся клонотипов первого донора, обнаруженных в обеих репликах, продемонстрировало высокую степень корреляции двух образцов –  $R^2 = 1$  (Рисунок 10.А, донор 1).

Таблица 9. Глубокое секвенирование иммунных репертуаров.

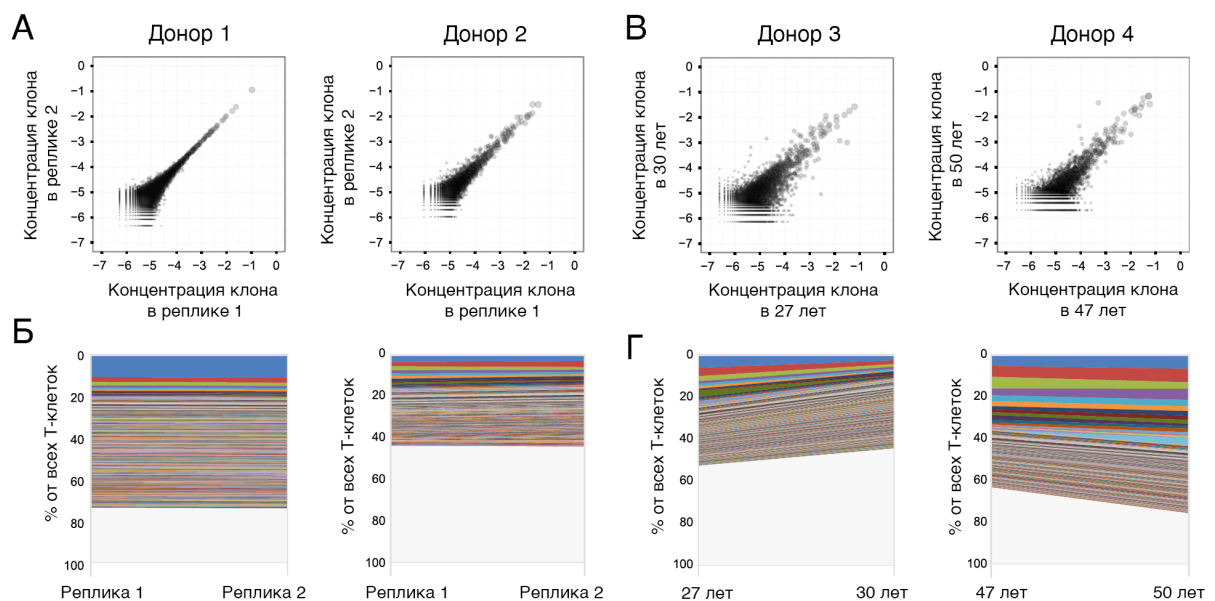
Донор	Возраст	Число клеток, млн РВМС	Количество CDR3 содержащих ридов	Количество проанализированных молекул кДНК*	Количество уникальных клонотипов	Количество общих клонотипов для двух точек	Процент пересечения, %**	Корреляция пересекающихся клонотипов (R <sup>2</sup> )
Донор 1	87	5	23 918 642	2 343 918	402 378	102 903	72	1,00
		3	25 684 335	2 649 250	401 771			
Донор 2	25	10	6 207 488	1 260 339	570 534	37 917	43	0,92
		5	6 101 552	1 032 585	467 651			
Донор 3	27 30	20	47 765 136	7 038 180	1 828 488	78 009	48	0,66
		9	10 464 702	1 531 400	760 839			
Донор 4	47 50	20	44 028 675	6 040 218	965 644	36 854	64	0,82
		8	2 713 450	518 116	137 682			

\* В анализе учитывались только кДНК молекулы, представленные не менее чем 2 последовательностями секвенирования.

\*\* Пересечение репертуаров было рассчитано как средний процент репертуара, занятый общими для двух точек клонотипами.

На основании чего мы пришли к выводу, что при использовании разработанного нового метода приготовления кДНК библиотек, их пробоподготовка, секвенирование и анализ полученных данных вносили минимальные количественные различия между образцами. В то же время мы обнаружили, что процедуры отбора проб, заморозки и последующая разморозка клеток могут вносить некоторую разницу, поскольку частоты клонотипов в двух отдельно обработанных и замороженных образцах РВМС для второго донора продемонстрировали несколько более низкую корреляцию ( $R^2 = 0,92$ , Рисунок 10.А, донор 2).

Гомеостатическое пространство, занимаемое общими для обеих реплик клонотипами, и размер наиболее представленных клонотипов были практически идентичны, что в целом подтвердило высокую точность метода (Рисунок 10.Б).



**Рисунок 10.** Стабильность Т-клеточного репертуара на примере парных реплик нескольких доноров. Точечные диаграммы частот клонотипов для двух технических реплик (А) или временных точек (В). Гистограмма изменения частот наиболее представленных клонотипов для двух доноров в репликах (Б) или с временным промежутком в три года (Г).

## 5.2. Возрастные изменения в тотальных Т-клеточных репертуарах

### 5.2.1. Стабильность Т-клеточного репертуара на протяжении трёх лет

Достаточно давно было установлено, что отдельные антиген-специфичные клоны Т-клеток памяти способны накапливаться в организме и поддерживать свою численность на протяжении длительного времени [141–144]. Однако не было показано, насколько сильно меняется репертуар Т-клеточных рецепторов в целом в течение определенного времени. Для того чтобы непосредственно оценить стабильность пула Т-клеток, мы провели глубокий анализ TCR $\beta$  репертуаров для двух взрослых здоровых доноров с разницей в три года (Таблица 9, доноры 3 и 4). Для первого донора (Донор 3 в Таблице 9) мы обнаружили 78009 TCR $\beta$  общих клонотипов, встречающихся в репертуарах этого донора в возрасте 27 и 30 лет. Для второго донора (Донор 4 в Таблице 9) мы нашли 36854 TCR $\beta$  общих для обеих временных точек (47 и 50 лет) клонотипов.

По прошествии трех лет основная часть клонотипов сохранила свои относительные частоты ( $R^2 = 0,861$  и  $0,905$  для доноров 3 и 4 соответственно; Рисунок 10.В). Хотя среди 1000 наиболее крупных клонов наблюдалось изменение концентрации в 2 и 1,8 раз. Из 1000 наиболее крупных клонов, наблюдаемых в первый момент времени, 952 и 882 были повторно идентифицированы через три года в репертуарах для доноров 3 и 4, соответственно. Аналогично из 1000 наиболее крупных клонов, наблюдаемых во второй временной точке, 962 и 966 клонов также были идентифицированы в первой временной точке для индивидуумов 3 и 4, соответственно.

Таким образом, мы наблюдали минимальные различия в тотальном Т-клеточном репертуаре за три года, сопоставимые с разницей между биологическими репликами, полученными в одно и то же время (см. “Результаты и их обсуждение”, п. 5.1.3.).

Обнаруженные в обеих временных точках клоны составляли в совокупности от 45 до 75% от общего количества Т-клеток в периферической крови (Рисунок 10.Г). И процент таких персистирующих клонов хорошо коррелировал долей Т-клеток памяти, измеренных с помощью проточной цитометрии (41 и 79% для доноров 3 и 4, соответственно). Данное наблюдение подтверждает информацию о том, что значительная часть клональных экспансий Т-лимфоцитов сохраняется в организме на протяжении многих лет.

Для того чтобы выявить точную природу Т-клеточных клонов, годами персистирующих в организме, мы с помощью FACS отсортировали и далее секвенировали TCR $\beta$  репертуары Т-лимфоцитов донора 3 (Таблица 9). Проведенный анализ показал, что отслеживаемые клоны занимали компартмент как CD8, так и CD4 Т-клеток памяти в сопоставимых пропорциях (~5:3). Примечательно, что отслеживаемые клоны CD8 Т-клеток были в основном представлены большими клональными экспансиями, тогда как клоны CD4 популяции характеризовались меньшей экспансией и в 5 раз большим разнообразием. Следовательно, некоторая часть стабильных, но низкочастотных клонов CD4 Т-клеток могла быть пропущена в нашем анализе из-за ограничений выборки.

Доля репертуара, занимаемая стабильными клонами, с возрастом увеличилась у старшего донора, но уменьшилась у младшего (Рисунок 10.Г). Можно предположить, что данное наблюдение свидетельствует о более быстром истощении клонов Т-клеток в молодом возрасте и продолжающейся экспансии долгоживущих клонов Т-клеток памяти у пожилых людей. Дальнейшие исследования с использованием глубокого секвенирования и долгосрочного мониторинга динамики репертуара Т-клеточных рецепторов на больших когортах доноров разного возраста позволят внести ясность в этом вопросе.

### 5.2.2. Динамика Т-клеточного репертуара

Для того чтобы охарактеризовать длительные изменения, затрагивающие Т-клеточный репертуар в течение жизни, мы проанализировали тотальные TCR $\beta$  репертуары из 8 образцов пуповинной крови (англ. *umbilical cord blood, UCB*) и 65 образцов периферической крови здоровых доноров разного возраста (Таблица 10). Пробоподготовка и секвенирование кДНК библиотек TCR $\beta$  были проведены по протоколу, подробно описанному в разделе “Материалы и методы”. Для корректного анализа из каждого образца мы случайным образом выбрали по 300000 TCR $\beta$  молекул кДНК. Такая выборка в репертуаре приблизительно соответствовала 300000 случайно выбранных Т-клеток. Параллельно мы с помощью проточной цитометрии измерили количество наивных CD8 и CD4 Т-клеток (CD27<sup>high</sup>CD45RA<sup>high</sup>) для 68 образцов и оценили абсолютное число CD3<sup>+</sup> клеток для 36 доноров из 73.

**Таблица 10.** Когорты доноров разного возраста.

Возрастная группа	Средний возраст (границы)	Количество доноров (Ж/М/Н*)	Наблюдаемое разнообразие последовательностей CDR3 TCR $\beta$ на $3 \cdot 10^5$ Т-клеток ( $\cdot 10^5$ )
UCB	0	8 (2/3/3)	$2,7 \pm 0,1$
Молодые	16 (6-25)	11 (4/7/0)	$2,2 \pm 0,3$
Взрослые	40 (30-50)	13 (7/6/0)	$1,6 \pm 0,5$
Пожилые	60 (51-75)	18 (11/7/0)	$1,4 \pm 0,6$
Долгожители	92 (85-103)	23 (15/8/0)	$0,9 \pm 0,4$

\* Неизвестно

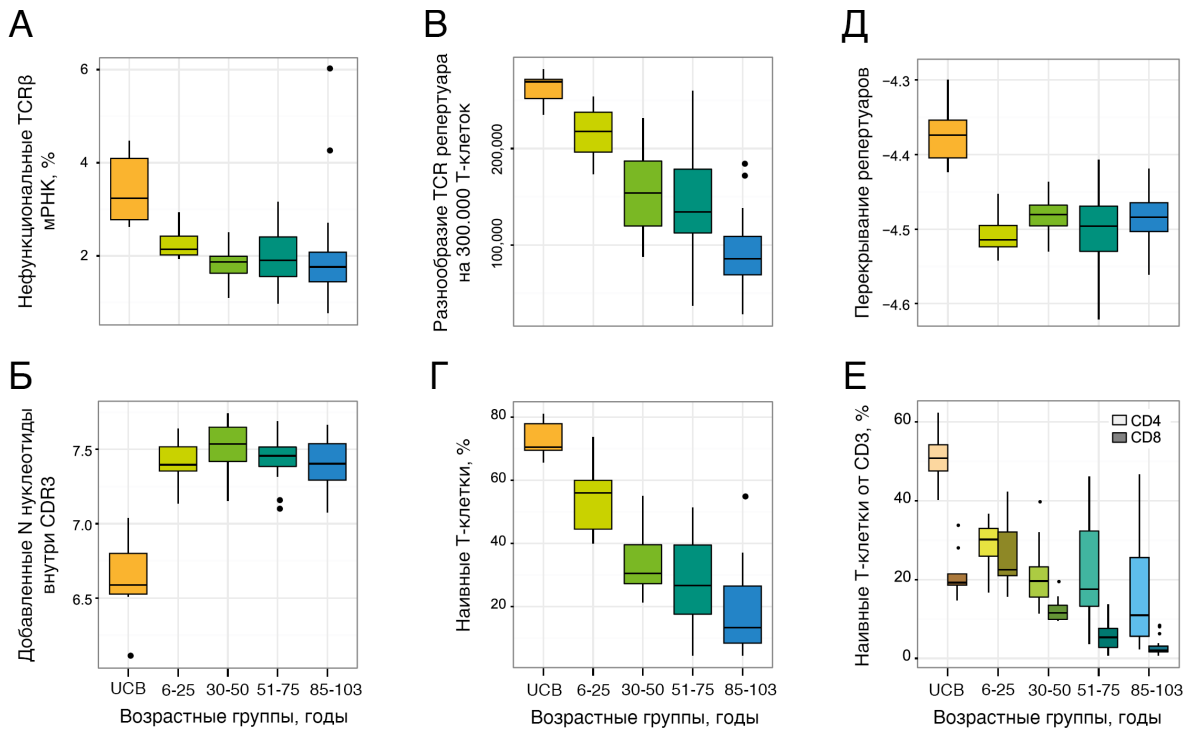
Проведенный сравнительный анализ выявил определенные признаки, характерные для Т-клеточного иммунитета в разные периоды жизни.

*Репертуары образцов пуповинной крови отличались большим количеством нефункциональных TCR*

Проанализировав полученные TCR $\beta$  репертуары доноров разных возрастных групп, мы обнаружили высокий процент нефункциональных молекул мРНК TCR $\beta$  для образцов пуповинной крови (Рисунок 11.А). Данные нефункциональные варианты содержали в своей последовательности CDR3 региона либо стоп-кодон, либо сдвиг в рамке считывания. Мы предположили, что поскольку количество нефункциональной мРНК в клетке определяется системой нонсенс-опосредованного распада мРНК (англ. *nonsense-mediated mRNA decay, NMD*) [145–147], полученный нами результат мог быть следствием подавления NMD во время пренатального периода. Известно, что низкая концентрация кислорода ингибирует NMD [148], а уровень кислорода в пуповинной крови по сравнению с периферической кровью взрослых доноров несколько ниже [149], что также может служить одним из возможных объяснений наблюдаемого явления. Хотя в то же время это может быть и следствием более специфических регуляторных механизмов NMD, которые играют важную роль в эмбриональном развитии [148,150,151].

*Репертуары UCB отличались небольшим числом N нуклеотидов*

Следующим нашим шагом стал расчет средней длины CDR3 участка и среднего количества случайно добавленных нуклеотидов на стыке между генными сегментами при перестройке генов T-клеточных рецепторов. Мы обнаружили, что образцы UCB характеризовались значительно меньшим количеством добавленных случайных нуклеотидов в CDR3 регион (в среднем по клонотипу), чем в других возрастных группах (Рисунок 11.Б). Ранее на основе результатов секвенирования отдельных клонотипов и анализа уровня экспрессии РНК TdT аналогичные наблюдения были показаны как у мышей, так и у людей [152–155]. С использованием высокопроизводительного секвенирования мы подтвердили эту особенность TCR репертуаров человека во время эмбрионального развития. Примечательно, что при нормировании на



**Рисунок 11.** Отличия TCR $\beta$  репертуаров доноров разных возрастных групп. Каждая возрастная группа помечена индивидуальным цветом. (А) Процент нефункциональных последовательностей TCR $\beta$  мРНК. (Б) Среднее число добавленных нуклеотидов внутри CDR3 TCR $\beta$ . (В) Уникальное разнообразие Т-клеточных рецепторов на нормированные 300000 Т-клеток. (Г) Процент наивных клеток внутри репертуара от всех Т-клеток. Измерение выполнено с помощью проточной цитометрии. (Д) Нормированное перекрытие репертуаров между донорами внутри собственной возрастной группы. (Е) Доли наивных CD4 (светлый боксплот) и CD8 (тёмный боксплот) Т-клеток внутри репертуара, измеренные с помощью проточной цитометрии.

300000 Т-клеток она не влияла на разнообразие TCR $\beta$ , которое было самым высоким в образцах UCB по сравнению с образцами периферической крови взрослых доноров (Рисунок 11.В). Почти каждая отсекуенная молекула кДНК кодировала уникальный вариант TCR $\beta$ , а общее разнообразие приближалось к 250000 различных клонотипов на образец UCB.

Наибольшее индивидуальное разнообразие последовательностей CDR3  $\beta$ -цепей Т-клеточных рецепторов, наблюдаемое в образцах пуповинной крови, коррелировало с самым высоким процентом наивных Т-клеток, и оба параметра равномерно снижались с возрастом (Рисунок 11.Г). На основании чего мы пришли к выводу, что пониженная активность TdT в течение



пренатального периода не уменьшает разнообразие Т-клеточных рецепторов, хотя и ограничивает потенциально возможное разнообразие репертуара.

#### *Межиндивидуальное сходство репертуаров*

Низкая активность TdT в пренатальном периоде влияет на относительное межиндивидуальное сходство репертуаров UCB. Мы проанализировали среднее число общих клонотипов между неродственными донорами в каждой возрастной группе с нормировкой данных на разнообразие репертуара в образце. Данное сравнение отражало общее сходство в разнообразии репертуаров наивных Т-клеток и не учитывало размер анализируемых клонов. Перекрытие репертуаров было высоким между образцами UCB, где низкая активность TdT ограничивала теоретическое разнообразие полученных вариантов TCR $\beta$  [156]. Однако в дальнейшем оно существенно снижалось и оставалось стабильным на протяжении всего старения (Рисунок 11.Д).

#### *Динамика наивных CD4 и CD8 Т-клеток внутри репертуара*

Для большей части доноров (68 из 73) мы провели окрашивание поверхностными маркерами небольшой аликвоты цельной крови, чтобы оценить долю наивных CD4 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD27<sup>high</sup>CD45RA<sup>high</sup>) и наивных CD8 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD27<sup>high</sup>CD45RA<sup>high</sup>) Т-клеток. На основании данных проточной цитометрии мы наблюдали разную динамику наивных CD4 и CD8 Т-клеток внутри тотальной популяции Т-клеток. Наивные CD4 Т-клетки представляли более половины всех Т-клеток в образцах пуповинной крови, в то время как наивные CD8 – около 20%. В молодом возрасте соотношение наивных популяций CD4 и CD8 понемногу выравнивалось (Рисунок 11.Е). Процент наивных Т-клеток уменьшался с возрастом (Рисунок 11.Г), причем наибольшее снижение наблюдалось среди CD8 Т-клеток (Рисунок 11.Е). Учитывая общее сокращение количества Т-клеток в крови с возрастом [157],

уменьшение абсолютных количеств наивных Т-клеток на микролитр периферической крови было еще более существенным.

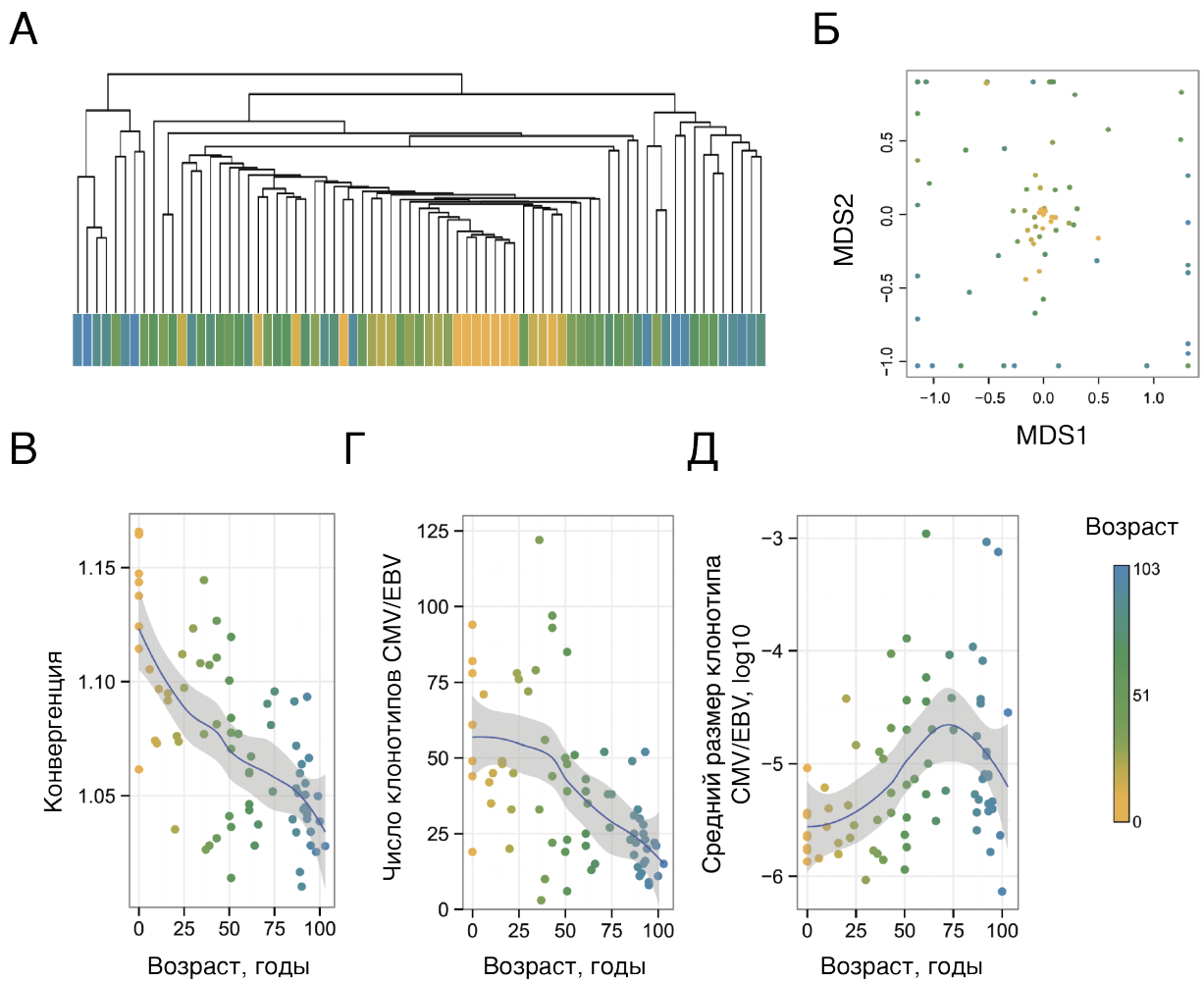
Далее мы проанализировали отношение доли наивных CD4 Т-клеток к доле наивных CD8 Т-клеток. Данный параметр не зависел от относительного содержания всех CD4 и CD8 клеток и хорошо отражал степень наивности CD4 репертуара по отношению к наивному CD8 репертуару. Проведенный анализ подтвердил наше предыдущее наблюдение [52], что популяция CD4 Т-клеток у самых пожилых доноров характеризуется более высокой долей наивных клеток сравнению с CD8 популяцией.

#### *Функциональное сходство репертуаров*

Мы провели анализ функционального сходства репертуаров и оценили корреляцию долей общих для двух доноров TCR репертуаров с возрастом, с учетом относительного размера рассматриваемых клонотипов. Анализ показал, что функционально репертуары TCR более похожи в детстве, но с увеличением возраста постепенно расходятся с этим общим базовым репертуаром (Рисунок 12.А-Б). Высокая доля пересекающихся клонов в образцах пуповинной крови и у детей, скорее всего была обусловлена множеством публичных клонотипов из пренатального репертуара с высокой вероятностью сборки (Рисунок 12.В) при отсутствии активности TdT в эмбриональном развитии (Рисунок 11.Б).

#### *Динамика CMV и EBV специфичных клонов*

Для того чтобы оценить изменения в пуле антиген-специфичных Т-клеточных рецепторов, мы изучили литературные источники и собрали список известных CMV и EBV специфичных TCR. Используя полученные данные, мы оценили изменение с возрастом количества и размера найденных клонотипов в репертуарах наших доноров (Рисунок 12.Г-Д). Мы обнаружили снижение количества CMV и EBV специфичных вариантов TCR у пожилых



**Рисунок 12.** Расхождение репертуаров с возрастом. (А, Б) Кластерный анализ, где дистанция между донорами пропорциональна сумме частот перекрывающихся клонотипов. (А) Дендрограмма на основе иерархической кластеризации. (Б) MDS анализ. (В) Конвергенция VDJ рекомбинации. Рассчитана на основании среднего числа нуклеотидных последовательностей CDR3, соответствующих одной аминокислотной последовательности CDR3. (Г) Общее число CMV и EBV специфичных клонотипов, обнаруженных в репертуарах. (Д) Средний размер CMV/EBV специфичного клонотипа.

доноров. В то же время средний размер таких клонотипов с возрастом увеличивался, причем в когорте от 51 до 75 лет наблюдался 7-кратный рост по сравнению с образцами пуповинной крови (Рисунок 12.Д). На основании полученных наблюдений мы предположили, что за счет изначально огромного разнообразия наивного репертуара в молодости в нем присутствует большое количество вирус-специфичных вариантов TCR. В процессе роста и развития организма, его коммуникации с окружающей средой происходит отбор и

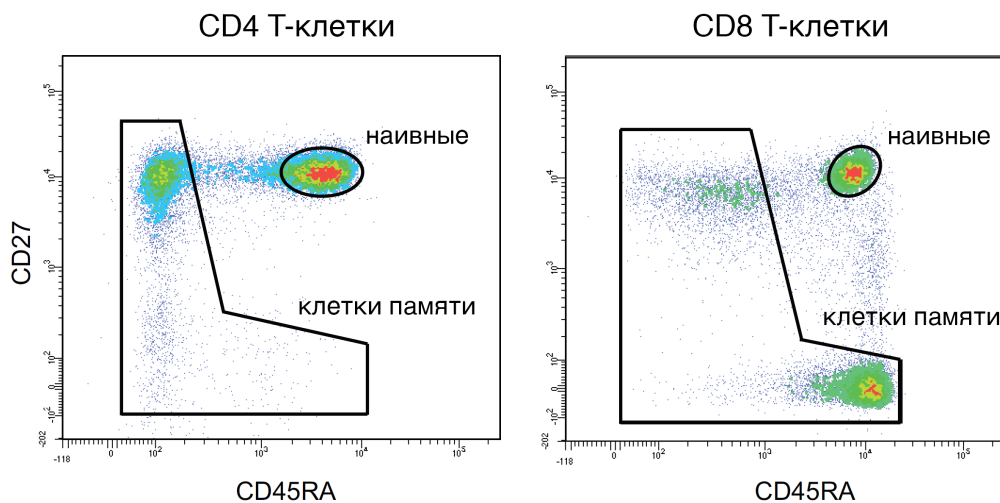
пролиферация определенных CMV и EBV специфичных клонов, которые в ходе своей дальнейшей экспансии вытесняют первоначальное разнообразие антиген-специфичного репертуара.

Интересно, что в глубокой старости мы наблюдали уменьшение размера CMV и EBV специфичных клонотипов (Рисунок 12.Д). Данное наблюдение могло быть связано как с общим истощением антиген-специфичного репертуара Т-клеток в старости, так и с особым возрастным барьером, способствующим долголетию людей с низким уровнем CMV и EBV инфекции [58,158].

### 5.3. Изменение характеристик наивных репертуаров с возрастом

#### 5.3.1. Характеристики TCR репертуаров наивных CD4 и CD8 Т-клеток

После наблюдаемой динамики наивных CD4 и CD8 Т-клеток внутри репертуара на основании данных проточной цитометрии (Рисунок 11.Е) мы решили оценить возрастные изменения характеристик наивных репертуаров Т-клеточных рецепторов. Для этого мы отсортировали с помощью FACS наивные CD4 Т-клетки, выделенные как  $CD3^+CD4^+CD27^{high}CD45RA^{high}$ , и наивные CD8 Т-клетки, гейтированные как  $CD3^+CD4^-CD27^{high}CD45RA^{high}$  (Рисунок 13), из образцов периферической крови для 6 молодых доноров (возрастом от 25 и до 32 лет) и 7 взрослых/пожилых доноров (возрастом от 51 года и до 88 лет). Перечень образцов доноров, вошедших в данное исследование, приведен в Таблице 11. Приготовление кДНК библиотек генов TCR и высокопроизводительное секвенирование было выполнено по разработанному нами протоколу [107].



**Рисунок 13.** Пример выделения популяций наивных и Т-клеток памяти для CD4 и CD8 лимфоцитов одного молодого донора.

Наши данные мы дополнили данными из недавно опубликованной работы [53]. В работе коллеги рассматривали изменение разнообразия и возрастную селекцию CD4 и CD8 Т-клеточных репертуаров для 4 молодых (от

20 до 35 лет) и 5 пожилых (от 70 до 85 лет) здоровых доноров. При сортировке CD4 и CD8 Т-клеток исследователи использовали схожую с нашей стратегию гейтирования наивных популяций (наивные клетки были выделены как CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup>CD28<sup>+</sup>), поэтому мы включили эти данные в проводимый анализ, чтобы дополнить имеющиеся у нас когорты доноров.

Анализ последовательностей секвенирования для объединенных данных был проведен с использованием программного обеспечения MiXCR и VDJtools, разработанного сотрудниками нашей лаборатории [110,111]. В этом эксперименте данные обрабатывались на основании полученных последовательностей без учета UMI, поскольку библиотеки Т-клеточных рецепторов в работе Qi et al.[53] были приготовлены по протоколу мультиплексного ПЦР без использования молекулярных баркодов.

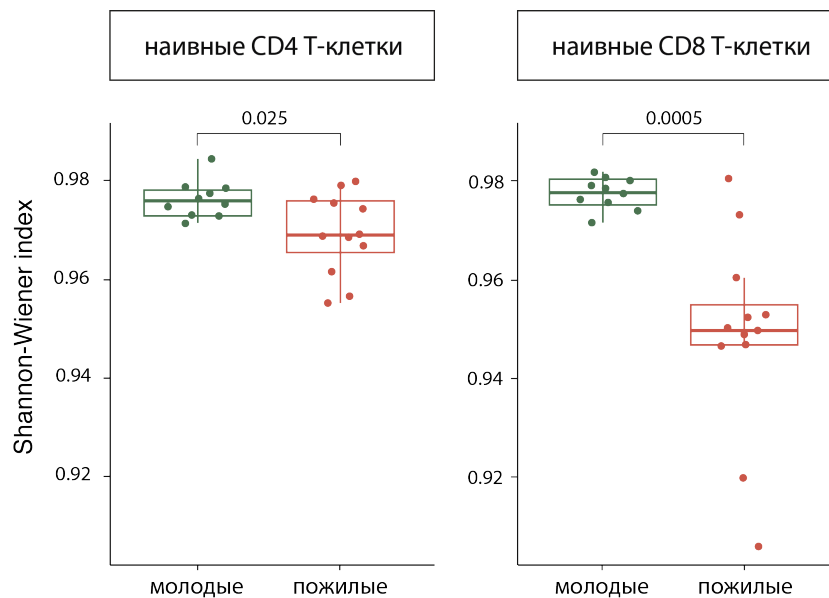
**Таблица 11.** Когорты доноров разного возраста и количество отсортированных наивных CD4 и CD8 Т-клеток.

Возрастная группа	Средний возраст (границы)	Количество доноров	Популяция наивных Т-клеток	Среднее число отсортированных клеток (границы)
Молодые	30 (25-32)	6	CD4	345.000 (100.000-500.000)
			CD8	404.000 (250.000-500.000)
Молодые из Qi et al.	28 (20-35)	4	CD4	1.000.000
			CD8	1.000.000
Пожилые	65 (51-88)	7	CD4	230.000 (100.000-500.000)
			CD8	150.000 (12.000-500.000)
Пожилые из Qi et al.	78 (70-85)	5	CD4	1.000.000
			CD8	250.000

Также мы использовали данные по репертуарам популяций клеточной памяти для CD4 и CD8 Т-клеток, которые были отсортированы и отсекуированы параллельно с образцами наивных Т-лимфоцитов. Перекрестный анализ данных по репертуарам наивных и Т-клеток памяти позволил исключить влияние контаминации клональными экспансиями Т-клеток памяти, которая могла произойти при сортировке целевых наивных популяций (Рисунок 13). При помощи функции “Decontaminate” в VDJtools [111] из наивных TCR репертуаров были отфильтрованы клонотипы, присутствующие в популяции клеток памяти. Аналогичным образом были обработаны и данные из работы Qi et al. Данная процедура удаляла из данных от 0,005 до 0,5% ридов секвенирования и от 0,01 до 0,7% клонотипов, и эти числа не зависели возрастной группы доноров. Несмотря на низкую долю исключенных ридов и клонотипов, такая процедура необходима для точности всего анализа и общего контроля клеточной контаминации во время сортировки.

Результаты анализа объединенных данных с использованием нормализованного индекса разнообразия Шеннона-Винера подтвердили заключение Qi и коллег [53], что с возрастом и CD4, и CD8 наивные Т-клетки накапливают клональные экспансии (Рисунок 14). Точность и воспроизводимость полученных результатов для молодых доноров подтвердила допустимость объединения данных обоих экспериментов, несмотря на то, при сортировке клеток в двух исследованиях использовались разные стратегии гейтирования наивных Т-лимфоцитов:  $CCR7^+CD45RA^{high}CD28^+$  в работе Qi et al. и  $CD27^{high}CD45RA^{high}$  у нас.

В дальнейшей работе мы рассматривали изменения в репертуарах только для 10 наиболее представленных TRBV генных семейств: TRBV5-1, TRBV6-5, TRBV7-8, TRBV7-9, TRBV12-3, TRBV18, TRBV19, TRBV20-1, TRBV28 и TRBV29-1. Такой подход обладал определенными преимуществами. Во-первых, наши коллеги при приготовлении библиотек



**Рисунок 14.** Наивные CD4 и CD8 Т-клетки накапливают клональные экспансии с возрастом. Показан нормализованный индекс разнообразия Шеннона-Винера для TCR $\beta$  CDR3 репертуаров. Объединенные данные из нашего исследования и Qi et al. [53].

TCR использовали технологию мультиплексной ПЦР [53], в то время как мы синтезировали кДНК с помощью 5'-RACE. Мультиплексная ПЦР из-за неравномерной амплификации смеси разных праймеров может приводить к существенному изменению частот представленных клонотипов в исходной библиотеке Т-клеточных рецепторов [52,133,134]. Амплификация фрагментов CDR3 внутри генного семейства при этом сохраняется равномерной. Поэтому использованный анализ репертуаров TCR по отдельным семействам позволил нам избежать подобных артефактов и корректно объединить доступные данные. Во-вторых, поскольку разные гены TRBV несут разные последовательности CDR1 и CDR2, непосредственно участвующие во взаимодействии TCR-pMHC, они способны по-разному влиять на усредненные свойства CDR3, которые мы анализировали ниже. Раздельный анализ сегментов TRBV позволил нейтрализовать это искусственное изменение. И в-третьих, различные гены TRBV соответствуют различным субпопуляциям Т-клеток, что позволило провести независимую оценку их свойств.

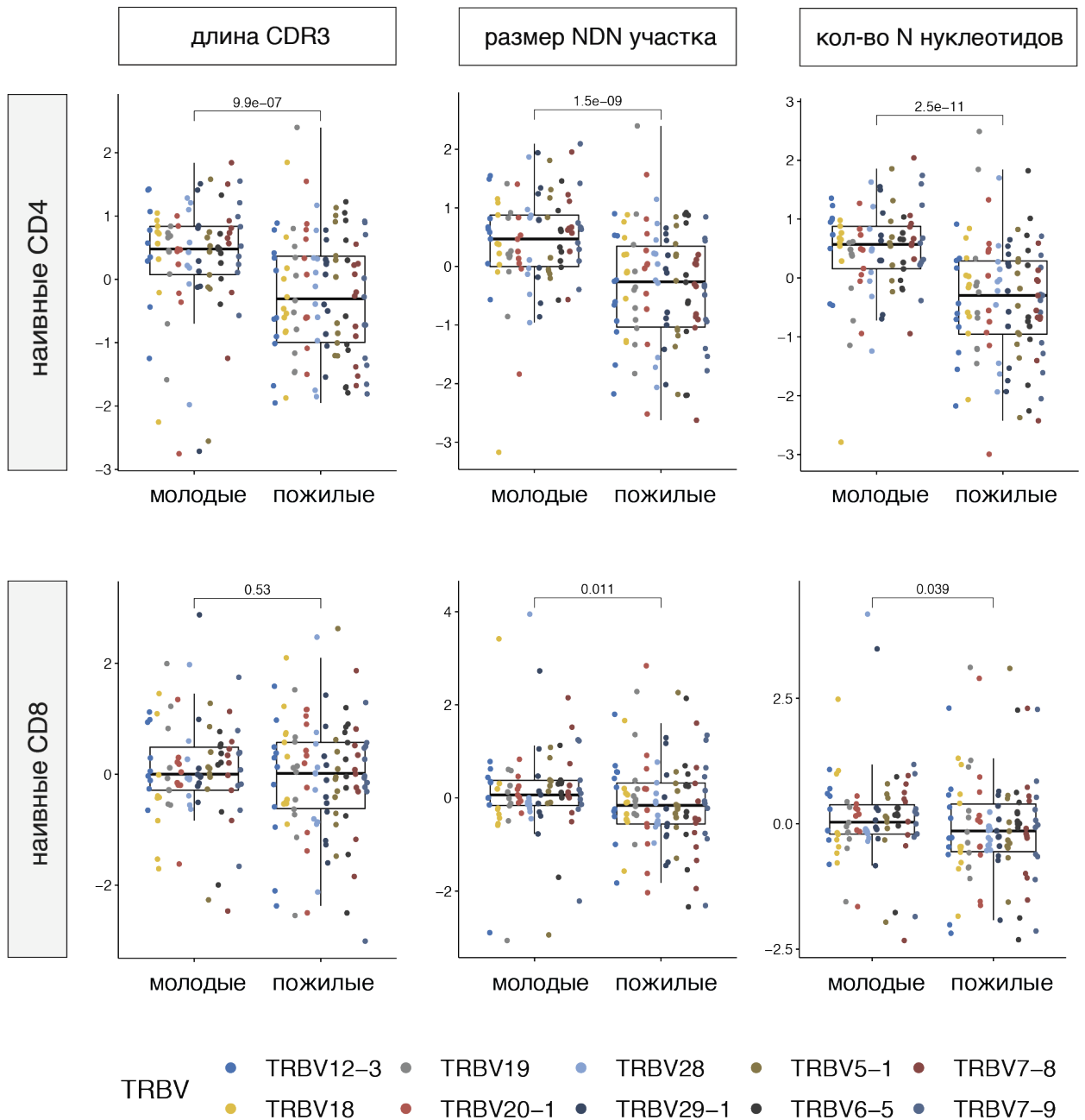


Все приведенные ниже характеристики были рассчитаны с учетом стандартизированной оценки – z-score нормализации. Такой подход выявил меру относительного разброса измеренных значений и позволил рассматривать значения приведенных характеристик репертуаров Т-клеточных рецепторов для всех указанных TRBV семейств вместе.

Мы рассмотрели изменение стандартных характеристик TCR репертуаров, таких как: средняя длина CDR3 участка в нуклеотидах, размер вставки NDN и количество случайно добавленных (N) нуклеотидов. Под вставкой NDN подразумевался участок внутри последовательности CDR3 между V и J сегментами и включающий в себя D сегмент (при наличии) и добавленные N нуклеотиды. N нуклеотиды – добавленные случайные нуклеотиды между генными сегментами за счет работы фермента TdT при перестройке генов Т-клеточных рецепторов во время созревания наивных Т-лимфоцитов в тимусе. Именно за счет данных нуклеотидов, их количества (соответственно и размера NDN региона), без учета комбинации пар V и J генных сегментов, во многом обеспечивается огромное разнообразие репертуаров TCR.

Мы обнаружили, что средняя длина CDR3, размер вставки NDN и количество добавленных нуклеотидов уменьшались с возрастом для наивных CD4 Т-клеточных репертуаров. В то же время для наивных CD8 репертуаров изменения носили минимальный характер, и статистически значимые различия были получены для размера вставки и среднего числа N нуклеотидов, количество которых как в случае с наивными CD4 клетками уменьшалось у пожилых доноров (Рисунок 15).

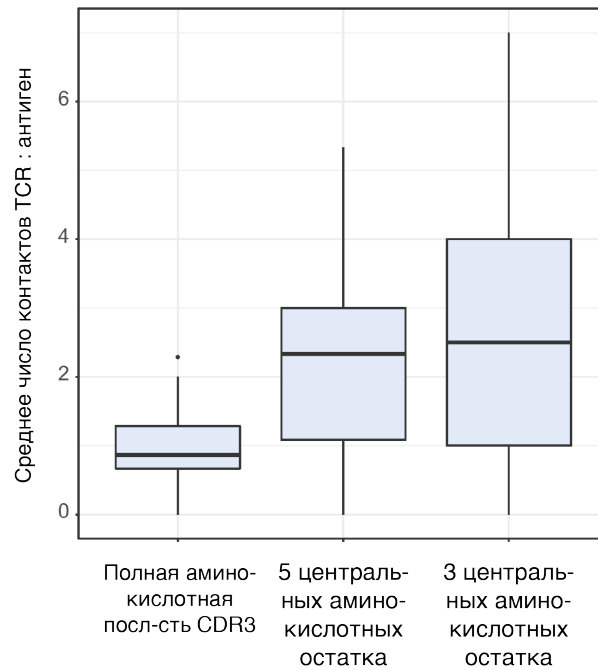
Кроме того, мы рассмотрели биофизические характеристики аминокислотных остатков в центральной части CDR3 региона (5 аминокислот), используя функцию “Annotate” в VDJTools. Как и в случае со стандартными характеристиками репертуаров TCR значения для всех использованных генных сегментов были выровнены с учетом z-score



**Рисунок 15.** Базовые характеристики репертуаров Т-клеточных рецепторов для наивных CD4 и CD8 Т-клеток. Анализ проведен для 10 наиболее представленных TRBV генных сегментов. Характеристики приведены после z-score нормализации.

нормализации. Были проанализированы следующие показатели: strength, hydrophathy, polarity. Параметр “strength” учитывает силу взаимодействия аминокислотных остатков [159,160] и может быть интерпретирован как средневзвешенная аффинность Т-клеточного репертуара к рMHC комплексу и пептидному антигену, в частности, поскольку центральная часть CDR3

региона в основном контактирует с презентуемым пептидом (Рисунок 16). Например, значительная часть Т-лимфоцитов, в которых CDR3 регион образован аминокислотами, сильно взаимодействующими с антигеном, уходит в апоптоз во время созревания наивных Т-клеток в тимусе, формируя иммунологическую толерантность и предотвращая развитие аутоиммунных



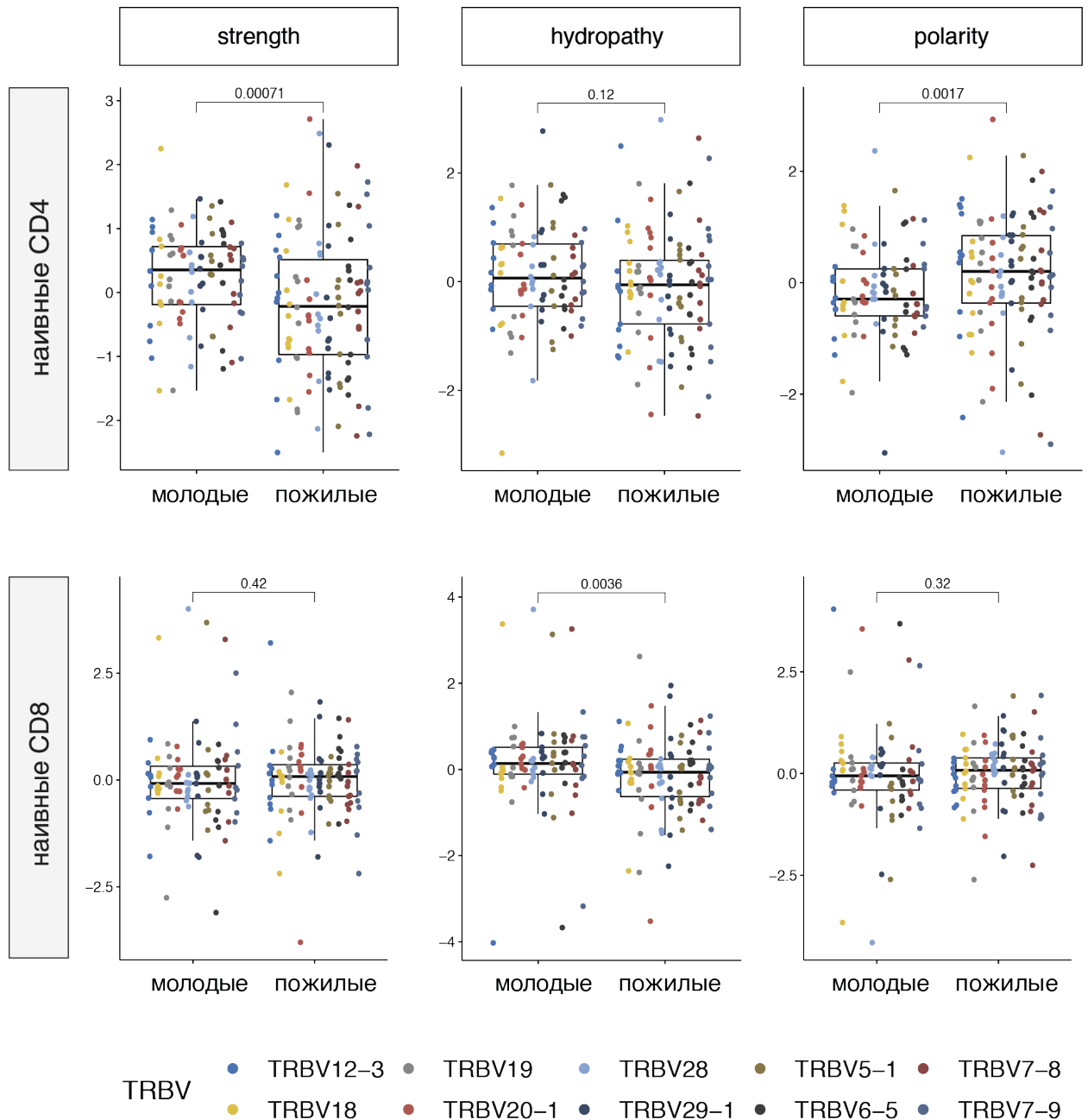
**Рисунок 16.** Среднее число пептидных контактов между презентуемым антигеном и полноразмерной последовательностью CDR3 Т-клеточного рецептора или только его центральной частью (5 и 3 аминокислотных остатка в центре CDR3 региона). ANOVA со сравнением разностей средних по методу Тьюки (post hoc Tukey test) выявил значительно большее число контактов для центрального региона CDR3 (5 и 3 аминокислотных остатка) по сравнению с полноразмерной последовательностью ( $P < 10^{-8}$ ) и отсутствие значимых различий между 5 и 3 аминокислотами ( $P = 0,42$ ). Анализ проведен для TCR $\beta$  на основании 110 комплексов TCR:pMHC из Protein Data Bank.

воспалений. К “сильно взаимодействующим” аминокислотам относят фенилаланин (F), лейцин (L), изолейцин (I), метионин (M) и валин (V), способные образовывать гидрофобные контакты, а также ароматические аминокислоты – триптофан (W) и тирозин (Y), которые могут формировать самые разнообразные взаимодействия (стекинг, тиол-ароматические и другие

[161]), и могут состоять из электростатических, ван-дер-ваальсовых и гидрофобных сил.

Индекс “hydropathy” отражает степень гидрофобности аминокислотного остатка в CDR3 [162]. Например, для наиболее гидрофобных аминокислот – изолейцина (I) и валина (V) индекс “hydropathy” составил 4,5 и 4,2, соответственно, а для наиболее гидрофильных – аргинина (R) и лизина (K) – -4,5 и -3,9 единиц, соответственно. Параметр “polarity” связан со свойствами полярности/неполярности аминокислот. Полярными аминокислотами считались аспарагиновая (D) и глутаминовая (E), гистидин (H), лизин (K), аспарагин (N), глутамин (Q), аргинин (R), серин (S), треонин (T), тирозин (Y). Значения характеристик были взвешены по частоте соответствующих клонотипов – высоко представленные клонотипы оказывали сильное влияние на значения характеристик, а полученные результаты не зависели от глубины секвенирования или образца. Рассчитав указанные характеристики для наших TCR $\beta$  CDR3 репертуаров, мы наблюдали значимое изменение параметров “strength” и “polarity” у наивных CD4 и “hydropathy” у наивных CD8 Т-лимфоцитов с возрастом (Рисунок 17).

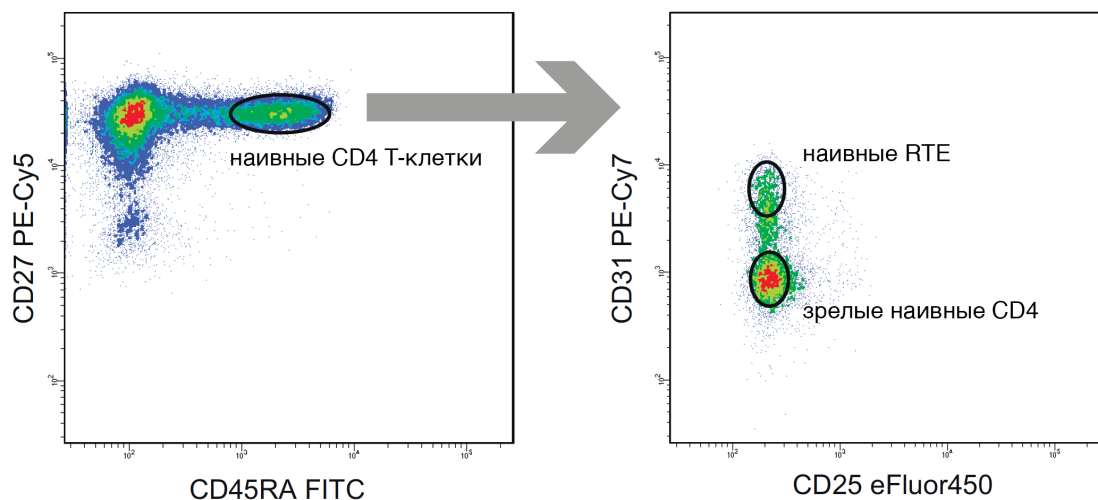
Данные наблюдения указывают на присутствие определенной периферической селекции наивного Т-клеточного репертуара при старении иммунной системы. Уменьшение с возрастом относительного содержания сильно взаимодействующих аминокислотных остатков и средней длины CDR3 в TCR $\beta$  репертуаре наивных Т-клеток может свидетельствовать о значительно более быстром истощении клонов наивных Т-клеток с высокой аффинностью к собственным рМНС. Это может являться результатом более эффективной передачи тонических сигналов и, как правило, более быстрой пролиферации, а затем истощения пролиферативной способности и исчезновения таких наивных Т-клеток из общего репертуара [163].



**Рисунок 17.** Биофизические характеристики репертуаров Т-клеточных рецепторов наивных CD4 и CD8 Т-клеток. Характеристики приведены с учетом z-score нормализации. Для сравнения биофизических свойств репертуаров молодых (25-35 лет) и пожилых (51-88) доноров были выбраны следующие характеристики аминокислотных остатков внутри CDR3 региона: “strength” (сила взаимодействия), “hydropathy” (гидрофильность/гидрофобность) и “polarity” (полярность). Анализ проведен для 10 наиболее крупных TRBV генных семейств.

### 5.3.2. Изменения характеристик в репертуарах RTE и зрелых наивных CD4 Т-клеток

Обе субпопуляции наивных CD4 Т-клеток – зрелые наивные CD4 Т-клетки (CD45RA<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>) и молодые Т-клетки, недавно покинувшие тимус, RTE (англ. *recent thymic emigrants*) (CD45RA<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>) – способны поддерживать свою численность за счет периферического деления. При этом делящиеся клетки из популяции RTE способны продолжительное время сохранять экспрессию CD31 маркера [164]. Тем не менее, со временем количество CD45RA<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> наивных CD4 Т-клеток в организме заметно уменьшается [164,165]. Считается, что субпопуляция зрелых наивных CD31<sup>-</sup> Т-клеток пролиферирует и поддерживает свое количество более эффективно, чем CD31<sup>+</sup>, однако для обеих групп был показан сопоставимый уровень укорочения теломер с возрастом [164].



**Рисунок 18.** Стратегия выделения субпопуляций RTE и зрелых наивных CD4 Т-клеток при сортировке с помощью FACS на примере одного молодого донора.

Следовательно можно предположить, что характеристики зрелых CD31<sup>-</sup> наивных CD4 Т-клеток изменяются более существенно, чем характеристики RTE. А свойства наивных CD4 Т-клеток в целом могут меняться как за счет внутренних различий между свойствами RTE и зрелых наивных Т-клеток, так

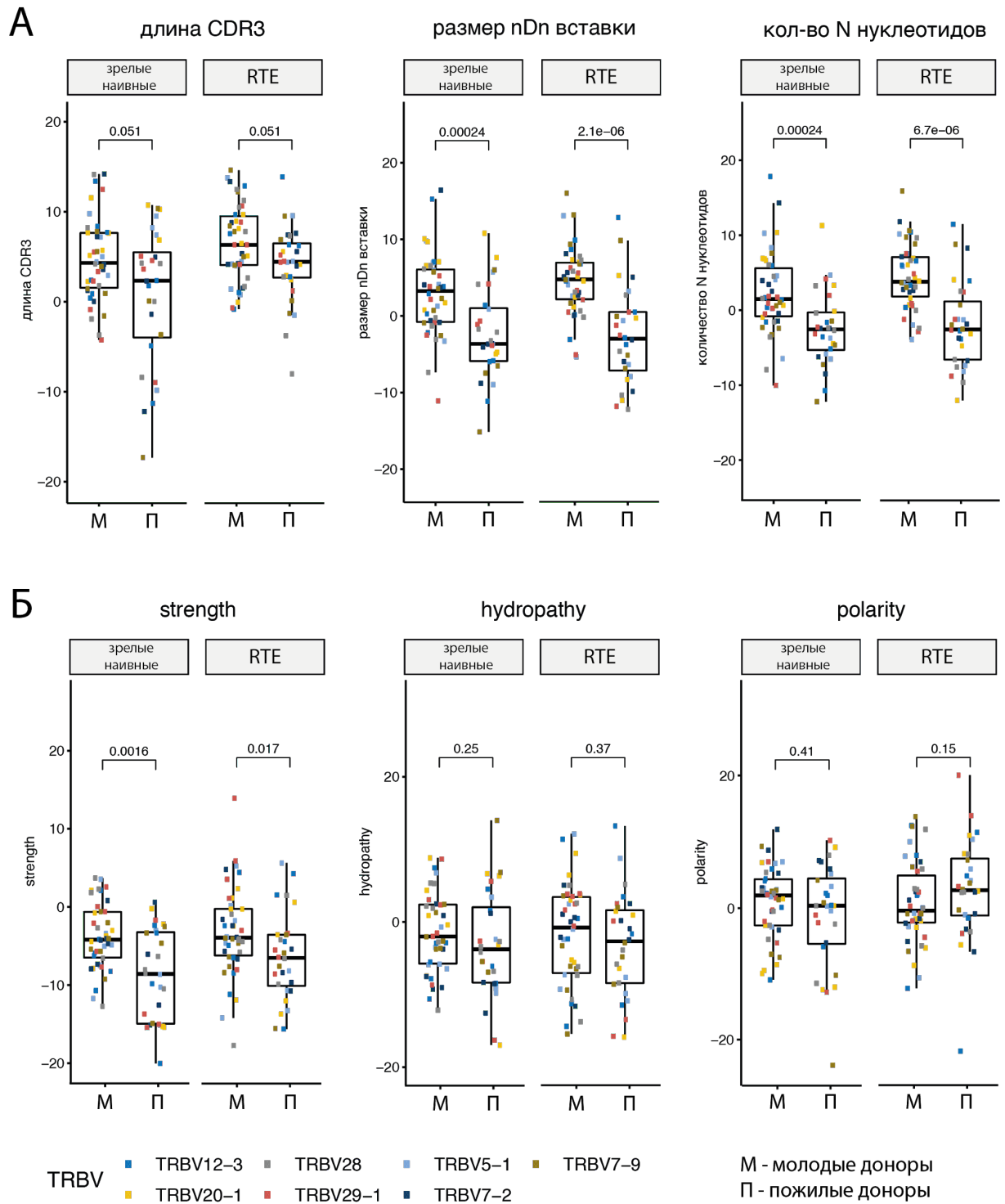
и за счет уменьшения доли CD31<sup>+</sup> клеток с возрастом в популяции наивных CD4 Т-клеток [165].

Для проверки последнего предположения мы сравнили характеристики TCR $\beta$  репертуаров отсортированных субпопуляций RTE (CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup>CD27<sup>high</sup>CD31<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) и зрелых наивных CD4 Т-клеток (CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup>CD27<sup>high</sup>CD31<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>) для 6 молодых и 4 пожилых здоровых доноров (Таблица 12, Рисунок 18). Сортировка CD25<sup>-</sup> наивных CD4 Т-клеток позволила исключить вклад в анализ регуляторных Т-клеток (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, англ. *Treg*), характеристики которых существенно отличаются от канонических CD4 Т-клеток [166–169].

**Таблица 12.** Когорты использованных в работе доноров разного возраста и количества сортированных наивных RTE и зрелых наивных CD4 Т-клеток.

Возрастная группа	Средний возраст (границы)	Количество доноров	Популяция наивных CD4 Т-клеток	Среднее число отсортированных клеток (границы)
Молодые	29 (26-32)	6	RTE	78.000 (50.000-150.000)
			зрелые CD4	70.000 (50.000-110.000)
Пожилые	67 (51-82)	4	RTE	79.000 (13.000-176.000)
			зрелые CD4	134.000 (100.000-218.000)

Анализ полученных CDR3 последовательностей показал, что похожие изменения наблюдались в TCR $\beta$  репертуарах зрелых наивных CD4 и RTE Т-лимфоцитов (Рисунок 19). Характеристики обеих субпопуляций наивных CD4 Т-клеток были практически идентичны внутри каждой возрастной группы, но заметно различались между молодыми и пожилыми донорами как при рассмотрении стандартных характеристик CDR3 TCR репертуаров (Рисунок 19.А), так и при анализе биофизических свойств аминокислотных остатков, образующих центр CDR3 региона (Рисунок 19.Б).

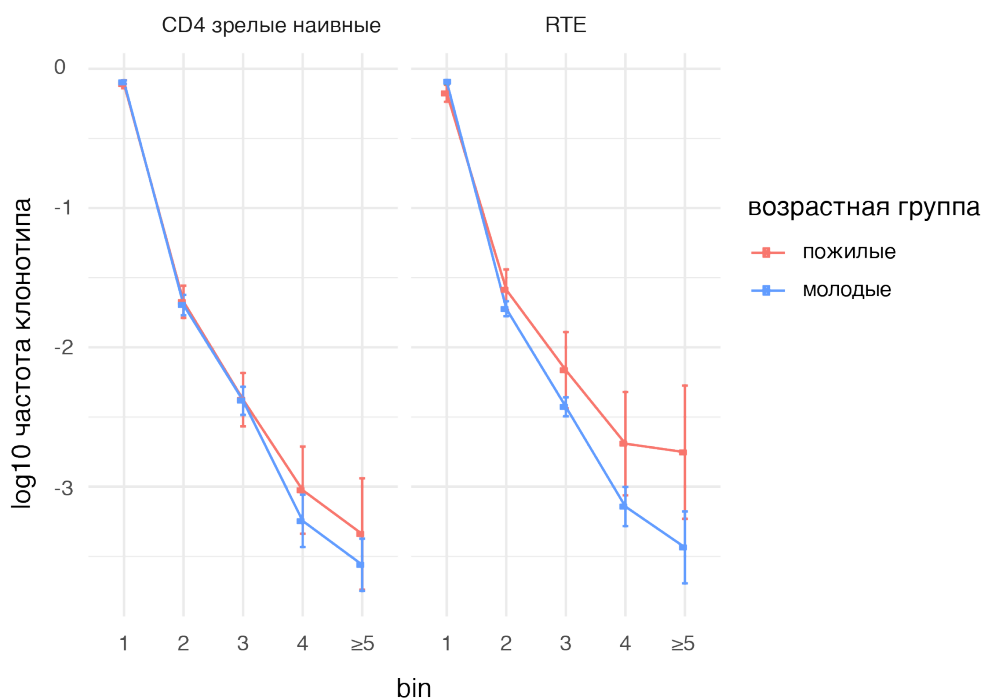


**Рисунок 19.** Свойства репертуаров для зрелых наивных и RTE обогащенных популяций внутри 7 наиболее широко представленных семейств наивных CD4 Т-клеток. Z-score нормализация выполнена для объединенного сравнения TRBV генных семейств. (А) Средний размер участка CDR3, размер NDN вставки и количество добавленных N нуклеотидов. (Б) Биофизические характеристики для 5 центральных аминокислот внутри CDR3 региона. М – когорта молодых доноров (от 26 до 31 года), П – пожилые доноры (от 51 до 82 лет).



Отдельно стоит отметить, поскольку мы наблюдали уменьшение средней длины CDR3 участка с возрастом, более длинные фрагменты V и J сегментов могли быть вовлечены в наш анализ при рассмотрении биофизических характеристик 5 центральных аминокислотных остатков CDR3. Это, в свою очередь, могло повлиять на конечный расчет усредненных свойств аминокислот. Однако, если подобное влияние и присутствовало, то было незначительным, поскольку различные сегменты TRBV вели себя одинаково в нашем анализе.

По аналогии с наивными CD4 и CD8 Т-клетками (Рисунок 14), RTE и зрелые наивные CD4 Т-клетки продемонстрировали тенденцию к росту клональных экспансий среди пожилых доноров (Рисунок 20).



**Рисунок 20.** С возрастом в популяциях RTE и зрелых наивных CD4 Т-клеток накапливаются клональные экспансии. bin – ранговый порядок клонотипа, где 1 – самые крупные клоны, а 5 – наиболее мелкие.

Таким образом мы пришли к выводу, что наблюдаемые изменения в пуле наивных CD4 Т-клеток затрагивают обе субпопуляции и RTE, и зрелых

наивных клеток и не зависят от падения доли RTE с возрастом или изменения соотношения CD31<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup> клеток в целом.

Одно из возможных объяснений наблюдаемых изменений в характеристиках TCR репертуаров наивных Т-клеток при старении, состоит в том, что клонотипы с высокой аффинностью уходят из пула наивных Т-клеток в ходе возникающих иммунных ответов. Ранее показано, что и CD4, и CD8 Т-клетки с высокой силой передачи тонических сигналов доминируют в ответах на чужеродные антигены [170–172]. При этом положительный отбор в тимусе способствует выработке наиболее эффективно реагирующих Т-клеток, которые используются в первую очередь и впоследствии первыми же покидают исходных пул Т-клеток. В таком случае возрастные изменения связаны с образованием заметных функциональных “дыр” в репертуаре Т-клеточных рецепторов наивных Т-лимфоцитов.

Дополнительным фактором, который вносит вклад в наблюдаемые нами изменения в наивных TCR $\beta$  репертуарах, может быть переход высоко аффинных (к собственным рМНС) клонов к фенотипу, похожему на фенотип Т-клеток памяти (англ. *“memory-like” phenotype*), как это было показано на мышинных моделях [28]. Однако присутствие подобного перехода для наивных Т-лимфоцитов человека еще не было четко показано [173].

### **5.3.3. Рост публичности репертуара наивных CD4 Т-клеток с возрастом**

Короткие CDR3 последовательности и небольшое число добавленных нуклеотидов часто оказываются ассоциированы с высокой публичностью таких репертуаров [174,175]. Поскольку мы наблюдали значительное укорочение длины CDR3 как у тотальных наивных CD4 (Рисунок 15), так и у субпопуляций RTE и зрелых наивных CD4 Т-клеток (Рисунок 19) с возрастом, мы предположили рост публичности наивных репертуаров у пожилых доноров. Для того чтобы оценить изменение публичности наивного CD4

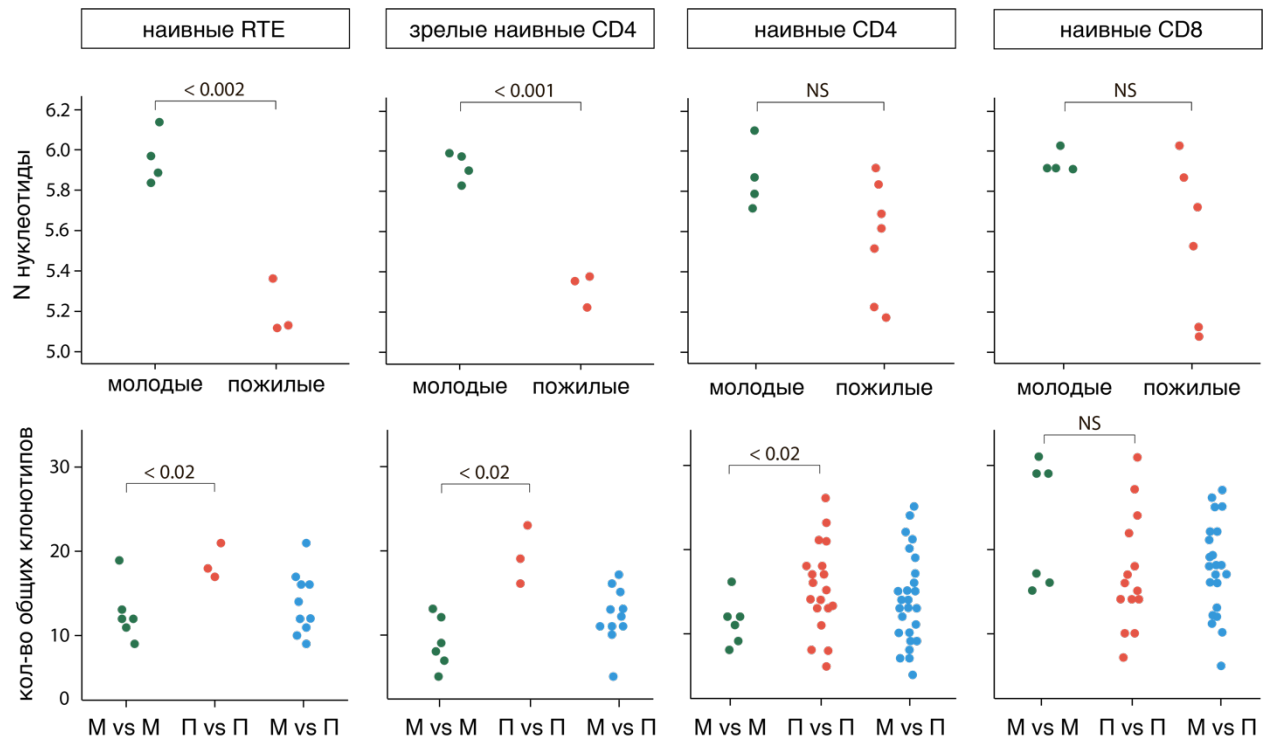
репертуара с возрастом, мы извлекли из данных 3000 наиболее крупных клонотипов для каждого донора. Сравнив перекрытие TCR $\beta$  CDR3 репертуаров наших доноров, мы обнаружили увеличение публичности наивного CD4, RTE и зрелого наивного репертуаров с возрастом (Рисунок 21). Умеренное перекрытие репертуаров было показано для молодых и взрослых/пожилых доноров среди наивных CD4, RTE и зрелых наивных CD4 Т-клеток. Однако, для наивных репертуаров CD8 Т-клеток мы не обнаружили изменение публичности с возрастом. Данное наблюдение не согласуется с работой Qi и коллег, где было показано уменьшение публичности наивного репертуара CD8 Т-клеток у пожилых доноров [53]. Анализ репертуаров расширенных когорт доноров в будущих исследованиях вместе хорошей нормализацией данных должен внести ясность в данном вопросе.

В итоге, в совокупности наблюдаемые изменения в структуре наивных репертуаров могут быть интерпретированы “вымывание” из общего пула наивных Т-клеток вариантов Т-клеточных рецепторов, имеющих более высокое сродство к собственным и чужеродным антигенам в комплексе с МНС с возрастом.

Однако существует и альтернативное объяснение, которое заслуживает внимания. Более короткие варианты последовательностей CDR3, с меньшим количеством случайно добавленных N нуклеотидов и высокой публичностью репертуаров (Рисунок 11.Б и Д) представляют собой отличительные черты ранней группы наивных Т-клеток, образующихся во время эмбрионального развития [54,152–154]. Эта группа наивных Т-клеток происходит из отдельной популяции гемопоэтических стволовых клеток, которые могут обладать значительно более высоким пролиферативным потенциалом [176,177].

С учетом падения активности тимуса, которое наблюдается уже в зрелом возрасте [178,179], можно предположить, что в старости количество обычных наивных Т-клеток уменьшается после истощения их ограниченной способности к делению. При этом ранние наивные Т-клетки фетального

происхождения сохраняют пролиферативную активность и продолжают поддерживать свою численность на протяжении более длительного времени.



**Рисунок 21.** Относительная публичность наивных Т-клеточных репертуаров. Среднее число добавленных нуклеотидов для 3000 наиболее крупных клонотипов внутри каждого образца (в верхнем ряду). Анализ учитывал только CDR3 последовательности, где был определен D сегмент. Анализ выполнен для 4 молодых и 3 пожилых доноров – наивные RTE и зрелых наивные CD4 и для 4 молодых и 7 пожилых доноров – наивные CD4 и CD8 Т-клетки. Количество перекрывающихся аминокислотных последовательностей CDR3 для каждой пары доноров: М vs М – молодой донор против другого молодого, П vs П – пожилой против другого пожилого донора, М vs П – молодой донор против пожилого донора (в нижнем ряду). Анализ учитывал только 3000 наиболее крупных клонотипов.

## 6. Выводы

1. На основе технологий 5'-RACE и молекулярного баркодирования (UMI) был разработан метод анализа репертуаров Т-клеточных рецепторов, применимый в том числе для небольших стартовых количеств клеток (несколько сотен), позволяющий корректно и нормировано сравнивать их характеристики.
2. С применением разработанного метода была продемонстрирована возможность предсказания нативных пар  $\alpha\beta$  цепей Т-клеточных рецепторов.
3. Была показана высокая стабильность периферического Т-клеточного репертуара человека: значительная часть крупных клонотипов, занимающих не менее половины репертуара взрослого здорового донора, сохраняет свои частоты на протяжении как минимум трех лет.
4. С использованием разработанного метода были проанализированы тотальные TCR $\beta$  репертуары периферической крови доноров разного возраста (от 6 до 103 лет) и образцов пуповинной крови (UCB). Было показано, что:
  - a. репертуары UCB отличаются большим количеством нефункциональных последовательностей CDR3 TCR, небольшим числом добавленных N нуклеотидов и высоким межиндивидуальным сходством;
  - b. процент наивных CD4 и CD8 клеток практически линейно падает с возрастом и напрямую коррелирует с сокращением разнообразия репертуара ТКР. При этом популяция CD4 Т-клеток у самых пожилых доноров (со средним возрастом 92 года) характеризуется более высокой долей наивных клеток сравнению с CD8 популяцией;
  - c. с возрастом уменьшается общее количество CMV и EBV специфичных клонотипов, при этом наблюдается увеличение среднего размера подобных клонотипов.

- d. возрастная группа долгожителей (средний возраст 92 года) по сравнению с группой пожилых доноров (средний возраст 60 лет) отличается меньшим количеством и размером CMV и EBV специфичных клонотипов, что вместе с относительно высокой долей наивных CD4 Т-клеток может указывать на наличие возрастного отбора и быть связано с долголетием.
5. Проанализированы CDR3 TCR $\beta$  репертуары наивных CD4 и CD8 клеток периферической крови для доноров двух возрастных групп. Было показано, что:
- a. у пожилых доноров наблюдается рост клональных экспансий наивных CD4 и CD8 Т-клеток;
  - b. репертуары наивных CD4 Т-клеток пожилых доноров характеризуются уменьшением длины CDR3 участка, размера NDN вставки и количества N нуклеотидов. Для CD8 клеток эти изменения не наблюдаются, либо носят слабо выраженный характер;
  - c. происходит изменение биофизических характеристик центральной части CDR3 региона у наивных CD4 Т-клеток, что в совокупности с изменением базовых характеристик может быть следствием периферической селекции наивного Т-клеточного репертуара с возрастом;
  - d. с возрастом наблюдается рост публичности наивного CD4 репертуара, что может быть ассоциировано с преимущественной селекцией коротких вариантов CDR3 с меньшим количеством добавленных нуклеотидов.
6. Наблюдаемые изменения в пуле наивных CD4 Т-клеток затрагивают как субпопуляцию недавних эмигрантов из тимуса (RTE), так и зрелых наивных клеток, и не зависят от падения доли RTE с возрастом или изменения соотношения CD31<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup> клеток в целом.

## 7. Заключение

Качественный анализ иммунных репертуаров имеет важное значение как для дальнейшего изучения адаптивного иммунитета, так и для разработки диагностических методов, особенно когда речь заходит об иммунных репертуарах конкретной функциональной или небольшой тканеспецифичной группы лимфоцитов [141].

Разработанный нами метод анализа иммунных репертуаров на основе УМІ является надежным и простым в реализации, хорошо защищает данные от артефактов, возникающих в ходе амплификации и секвенирования [107]. При этом молекулярное баркодирование позволяет сохранить естественное разнообразие анализируемой библиотеки последовательностей Т-клеточных рецепторов – что значительно упрощает сравнение иммунных репертуаров для самых разнообразных популяций лимфоцитов, между разными моделями животных или в определенный момент времени. В то же время молекулярное баркодирование существенно повышает точность количественного определения клонотипа, поскольку анализ основан на количестве исходных молекул кДНК, успешно прошедших все стадии пробоподготовки и секвенирования.

Используя разработанный нами метод, мы проанализировали возрастные изменения репертуаров как на уровне общего пула Т-клеток [54], так и на уровне функциональных субпопуляций [180-181]. Полученные нами данные были использованы при создании базы данных TCR с известной антигенной специфичностью [182-183]. Кроме того, мы показали значительные изменения характеристик наивных репертуаров CD4 Т-клеток (RTE и зрелых наивных CD4) с возрастом, которые могут являться ключом к пониманию старения иммунитета. Безусловный интерес представляют собой дальнейшие исследования различных функциональных как наивных, так и популяций Т-клеточной памяти доноров разного возраста.

## 8. Список сокращений

APC – антигенпрезентирующая клетка (англ. antigen-presenting cell)

CDR – регион, определяющий комплементарность (англ. complementarity determining region)

CLP – общие лимфоидные предшественники (англ. common lymphoid precursors)

CM – Т-клетки “центральной” памяти (англ. central memory)

CMV – цитомегаловирус

DLN – дренирующие лимфатические узлы (англ. draining lymph node)

DN – “двойные негативные” тимоциты (англ. “double-negative” thymocytes)

DP – “двойные позитивные” тимоциты (англ. “double-positive” thymocytes)

EBV – вирус Эпштейна-Барра (англ. Epstein-Barr virus)

EM – Т-клетки эффекторной памяти (англ. effector memory)

ETP – ранние предшественники Т-клеток (англ. early T-cell precursor)

FACS – флуоресцентно активированная сортировка клеток (англ. fluorescence-activated cell sorting)

HLA – человеческий лейкоцитарный антиген (англ. human leukocyte antigen)

HTS – высокопроизводительное секвенирование (англ. high-throughput sequencing)

KGF – фактор роста кератиноцитов (англ. keratinocyte growth factor)

MHC – главный комплекс гистосовместимости (англ. major histocompatibility complex)

NMD – система нонсенс-опосредованного распада мРНК (англ. nonsense-mediated mRNA decay)

PBMC – мононуклеарные клетки периферической крови (англ. peripheral blood mononuclear cells)

RACE – метод синтеза кДНК на базе РНК (англ. rapid amplification of cDNA ends)



RAG1 и RAG2 – гены, запускающие рекомбинацию (англ. *recombination activating genes*)

RTE – недавние эмигранты тимуса (англ. *recent thymic emigrants*)

RSSs – сигнальные последовательности рекомбинации (англ. *recombination signal sequences*)

TCR – Т-клеточный рецептор (англ. *T-cell receptor*)

TdT – терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза (англ. *terminal deoxynucleotidyl transferase*)

TRAC – константный сегмент гена  $\alpha$  цепи Т-клеточного рецептора

TRAJ – соединительный сегмент гена  $\alpha$  цепи Т-клеточного рецептора

TRAV – переменный сегмент гена  $\alpha$  цепи Т-клеточного рецептора

TRBC – константный сегмент гена  $\beta$  цепи Т-клеточного рецептора

TRBJ – соединительный сегмент гена  $\beta$  цепи Т-клеточного рецептора

TRBV – переменный сегмент гена  $\beta$  цепи Т-клеточного рецептора

Treg – регуляторные Т-клетки (англ. *regulatory T-cells*)

VM – Т-клетки виртуальной памяти (англ. *virtual memory*)

UCB – пуповинная кровь (англ. *umbilical cord blood*)

UDG – Урацил-ДНК-гликозилаза

UMI – уникальный молекулярный идентификатор, молекулярный баркод (англ. *unique molecular identifier*)

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

кДНК – комплементарная ДНК

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

## 9. Список литературы

1. Janeway CA, Murphy K, Travers P, Walport M. Janeway's Immunobiology. Garland Science. Taylor & Francis Group, New York; 2008.
2. Choo SY. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Med J.* 2007;48: 11–23.
3. Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol.* 2006;24: 419–466.
4. Bridgeman JS, Sewell AK, Miles JJ, Price DA, Cole DK. Structural and biophysical determinants of  $\alpha\beta$  T-cell antigen recognition. *Immunology.* 2012;135: 9–18.
5. Zoete V, Irving M, Ferber M, Cuendet MA, Michielin O. Structure-Based, Rational Design of T Cell Receptors. *Front Immunol.* 2013;4: 268.
6. Arstila TP. A Direct Estimate of the Human T Cell Receptor Diversity [Internet]. *Science.* 1999. pp. 958–961. doi:10.1126/science.286.5441.958
7. Call ME, Pyrdol J, Wiedmann M, Wucherpfennig KW. The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell.* 2002;111: 967–979.
8. Jamieson BD, Douek DC, Killian S, Hultin LE, Scripture-Adams DD, Giorgi JV, et al. Generation of functional thymocytes in the human adult. *Immunity.* 1999;10: 569–575.
9. Gray DHD, Ueno T, Chidgey AP, Malin M, Goldberg GL, Takahama Y, et al. Controlling the thymic microenvironment. *Curr Opin Immunol.* 2005;17: 137–143.
10. Yatim A, Benne C, Sobhian B, Laurent-Chabalier S, Deas O, Judde J-G, et al. NOTCH1 nuclear interactome reveals key regulators of its transcriptional activity and oncogenic function. *Mol Cell.* 2012;48: 445–458.
11. Meier-Stiegen F, Schwanbeck R, Bernoth K, Martini S, Hieronymus T, Ruau D, et al. Activated Notch1 target genes during embryonic cell differentiation depend on the cellular context and include lineage determinants and inhibitors. *PLoS One.* 2010;5: e11481.
12. Gardner P, Pabbatireddy S. Vaccines for women age 50 and older. *Emerg Infect Dis.* 2004;10: 1990–1995.
13. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). West Nile virus and other arboviral diseases--United States, 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2013;62: 513–517.
14. Kovacs EJ, Palmer JL, Fortin CF, Fülöp T Jr, Goldstein DR, Linton P-J. Aging and innate immunity in the mouse: impact of intrinsic and extrinsic factors.

Trends Immunol. 2009;30: 319–324.

15. Solana R, Tarazona R, Gayoso I, Lesur O, Dupuis G, Fulop T. Innate immunosenescence: effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans. *Semin Immunol.* 2012;24: 331–341.
16. Shaw AC, Goldstein DR, Montgomery RR. Age-dependent dysregulation of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013;13: 875–887.
17. Panda A, Arjona A, Sapey E, Bai F, Fikrig E, Montgomery RR, et al. Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. *Trends Immunol.* 2009;30: 325–333.
18. Berent-Maoz B, Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. Genetic regulation of thymocyte progenitor aging. *Semin Immunol.* 2012;24: 303–308.
19. Dixit VD. Impact of immune-metabolic interactions on age-related thymic demise and T cell senescence. *Semin Immunol.* 2012;24: 321–330.
20. Chinn IK, Blackburn CC, Manley NR, Sempowski GD. Changes in primary lymphoid organs with aging. *Semin Immunol.* 2012;24: 309–320.
21. Steinmann GG. Changes in the human thymus during aging. *Curr Top Pathol.* 1986;75: 43–88.
22. Haynes BF, Sempowski GD, Wells AF, Hale LP. The human thymus during aging. *Immunol Res.* 2000;22: 253–261.
23. Min H, Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. Reduction in the developmental potential of intrathymic T cell progenitors with age. *J Immunol.* 2004;173: 245–250.
24. Hale JS, Boursalian TE, Turk GL, Fink PJ. Thymic output in aged mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103: 8447–8452.
25. den Braber I, Mugwagwa T, Vrisekoop N, Westera L, Mögling R, de Boer AB, et al. Maintenance of peripheral naive T cells is sustained by thymus output in mice but not humans. *Immunity.* 2012;36: 288–297.
26. Kreher CR, Dittrich MT, Guerkov R, Boehm BO, Tary-Lehmann M. CD4+ and CD8+ cells in cryopreserved human PBMC maintain full functionality in cytokine ELISPOT assays. *J Immunol Methods.* 2003;278: 79–93.
27. Wertheimer AM, Uhrlaub JL, Hirsch A, Medigeshi G, Sprague J, Legasse A, et al. Immune response to the West Nile virus in aged non-human primates. *PLoS One.* 2010;5: e15514.
28. Sprent J, Surh CD. Normal T cell homeostasis: the conversion of naive cells into memory-phenotype cells. *Nat Immunol.* 2011;12: 478–484.
29. Naylor K, Li G, Vallejo AN, Lee W-W, Koetz K, Bryl E, et al. The influence of age on T cell generation and TCR diversity. *J Immunol.* 2005;174: 7446–7452.
30. Cicin-Sain L, Messaoudi I, Park B, Currier N, Planer S, Fischer M, et al.

- Dramatic increase in naive T cell turnover is linked to loss of naive T cells from old primates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104: 19960–19965.
31. Rudd BD, Venturi V, Li G, Samadder P, Ertelt JM, Way SS, et al. Nonrandom attrition of the naive CD8<sup>+</sup> T-cell pool with aging governed by T-cell receptor:pMHC interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108: 13694–13699.
  32. Decman V, Laidlaw BJ, Doering TA, Leng J, Ertl HCJ, Goldstein DR, et al. Defective CD8 T cell responses in aged mice are due to quantitative and qualitative changes in virus-specific precursors. *J Immunol.* 2012;188: 1933–1941.
  33. Chiu B-C, Martin BE, Stolberg VR, Chensue SW. Cutting edge: Central memory CD8 T cells in aged mice are virtual memory cells. *J Immunol.* 2013;191: 5793–5796.
  34. Haluszczak C, Akue AD, Hamilton SE, Johnson LDS, Pujanauski L, Teodorovic L, et al. The antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell repertoire in unimmunized mice includes memory phenotype cells bearing markers of homeostatic expansion. *J Exp Med.* 2009;206: 435–448.
  35. Weinreich MA, Odumade OA, Jameson SC, Hogquist KA. T cells expressing the transcription factor PLZF regulate the development of memory-like CD8<sup>+</sup> T cells. *Nat Immunol.* 2010;11: 709–716.
  36. Renkema KR, Li G, Wu A, Smithey MJ, Nikolich-Zugich J. Two separate defects affecting true naive or virtual memory T cell precursors combine to reduce naive T cell responses with aging. *J Immunol.* 2014;192: 151–159.
  37. Smithey MJ, Li G, Venturi V, Davenport MP, Nikolich-Zugich J. Lifelong persistent viral infection alters the naive T cell pool, impairing CD8 T cell immunity in late life. *J Immunol.* 2012;189: 5356–5366.
  38. Wertheimer AM, Bennett MS, Park B, Uhrlaub JL, Martinez C, Pulko V, et al. Aging and cytomegalovirus infection differentially and jointly affect distinct circulating T cell subsets in humans. *J Immunol.* 2014;192: 2143–2155.
  39. Su LF, Kidd BA, Han A, Kotzin JJ, Davis MM. Virus-specific CD4(+) memory-phenotype T cells are abundant in unexposed adults. *Immunity.* 2013;38: 373–383.
  40. Cole DK, Bulek AM, Dolton G, Schauenberg AJ, Szomolay B, Rittase W, et al. Hotspot autoimmune T cell receptor binding underlies pathogen and insulin peptide cross-reactivity. *J Clin Invest.* 2016;126: 3626.
  41. Welsh RM, Che JW, Brehm MA, Selin LK. Heterologous immunity between viruses. *Immunol Rev.* 2010;235: 244–266.
  42. Woodland DL, Blackman MA. Immunity and age: living in the past? *Trends Immunol.* 2006;27: 303–307.
  43. Nikolich-Zugich J, Slifka MK, Messaoudi I. The many important facets of T-

- cell repertoire diversity. *Nat Rev Immunol*. 2004;4: 123–132.
44. Nikolich-Zugich J. Ageing and life-long maintenance of T-cell subsets in the face of latent persistent infections. *Nat Rev Immunol*. 2008;8: 512–522.
  45. Blackman MA, Woodland DL. The narrowing of the CD8 T cell repertoire in old age. *Curr Opin Immunol*. 2011;23: 537–542.
  46. Callahan JE, Kappler JW, Marrack P. Unexpected expansions of CD8-bearing cells in old mice. *J Immunol*. 1993;151: 6657–6669.
  47. Posnett DN, Sinha R, Kabak S, Russo C. Clonal populations of T cells in normal elderly humans: the T cell equivalent to “benign monoclonal gammopathy.” *J Exp Med*. 1994;179: 609–618.
  48. Pannetier C, Even J, Kourilsky P. T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol Today*. 1995;16: 176–181.
  49. Hingorani R, Choi IH, Akolkar P, Gulwani-Akolkar B, Pergolizzi R, Silver J, et al. Clonal predominance of T cell receptors within the CD8<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> subset in normal human subjects. *J Immunol*. 1993;151: 5762–5769.
  50. LeMaout J, Messaoudi I, Manavalan JS, Potvin H, Nikolich-Zugich D, Dyllal R, et al. Age-related dysregulation in CD8 T cell homeostasis: kinetics of a diversity loss. *J Immunol*. 2000;165: 2367–2373.
  51. Bunztnan A, Vincent BG, Krovi H, Steele S, Frelinger JA. The LCMV gp33-specific memory T cell repertoire narrows with age. *Immun Ageing*. 2012; 9: 17.
  52. Britanova OV, Putintseva EV, Shugay M, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Staroverov DB, et al. Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling. *J Immunol*. 2014;192: 2689–2698.
  53. Qi Q, Liu Y, Cheng Y, Glanville J, Zhang D, Lee J-Y, et al. Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111: 13139–13144.
  54. Britanova OV, Shugay M, Merzlyak EM, Staroverov DB, Putintseva EV, Turchaninova MA, et al. Dynamics of Individual T Cell Repertoires: From Cord Blood to Centenarians. *J Immunol*. 2016;196: 5005–5013.
  55. Shifrut E, Baruch K, Gal H, Ndifon W, Deczkowska A, Schwartz M, et al. CD4(+) T Cell-Receptor Repertoire Diversity is Compromised in the Spleen but Not in the Bone Marrow of Aged Mice Due to Private and Sporadic Clonal Expansions. *Front Immunol*. 2013;4: 379.
  56. Sant S, Grzelak L, Wang Z, Pizzolla A, Koutsakos M, Crowe J, et al. Single-Cell Approach to Influenza-Specific CD8 T Cell Receptor Repertoires Across Different Age Groups, Tissues, and Following Influenza Virus Infection. *Front Immunol*. 2018;9: 1453.
  57. Looney RJ, Falsey A, Campbell D, Torres A, Kolassa J, Brower C, et al. Role

- of cytomegalovirus in the T cell changes seen in elderly individuals. *Clin Immunol.* 1999;90: 213–219.
58. Solana R, Tarazona R, Aiello AE, Akbar AN, Appay V, Beswick M, et al. CMV and Immunosenescence: from basics to clinics. *Immun Ageing.* 2012;9: 23.
  59. Derhovanessian E, Maier AB, Hähnel K, Beck R, de Craen AJM, Slagboom EP, et al. Infection with cytomegalovirus but not herpes simplex virus induces the accumulation of late-differentiated CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells in humans. *J Gen Virol.* 2011;92: 2746–2756.
  60. Chidrawar S, Khan N, Wei W, McLarnon A, Smith N, Nayak L, et al. Cytomegalovirus-seropositivity has a profound influence on the magnitude of major lymphoid subsets within healthy individuals. *Clin Exp Immunol.* 2009;155: 423–432.
  61. Litjens NH, de Wit EA, Betjes MG. Differential effects of age, cytomegalovirus-seropositivity and end-stage renal disease (ESRD) on circulating T lymphocyte subsets. *Immun Ageing.* 2011;8: 2.
  62. Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, Taormina C, Pelte C, Ruchti F, et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med.* 2005;202: 673–685.
  63. Hadrup SR, Strindhall J, Køllgaard T, Seremet T, Johansson B, Pawelec G, et al. Longitudinal studies of clonally expanded CD8 T cells reveal a repertoire shrinkage predicting mortality and an increased number of dysfunctional cytomegalovirus-specific T cells in the very elderly. *J Immunol.* 2006;176: 2645–2653.
  64. Pourgheysari B, Khan N, Best D, Bruton R, Nayak L, Moss PAH. The cytomegalovirus-specific CD4<sup>+</sup> T-cell response expands with age and markedly alters the CD4<sup>+</sup> T-cell repertoire. *J Virol.* 2007;81: 7759–7765.
  65. Khan N, Shariff N, Cobbold M, Bruton R, Ainsworth JA, Sinclair AJ, et al. Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. *J Immunol.* 2002;169: 1984–1992.
  66. Wang GC, Dash P, McCullers JA, Doherty PC, Thomas PG. T cell receptor  $\alpha\beta$  diversity inversely correlates with pathogen-specific antibody levels in human cytomegalovirus infection. *Sci Transl Med.* 2012;4: 128ra42.
  67. Cicin-Sain L, Brien JD, Uhrlaub JL, Drabig A, Marandu TF, Nikolich-Zugich J. Cytomegalovirus infection impairs immune responses and accentuates T-cell pool changes observed in mice with aging. *PLoS Pathog.* 2012;8: e1002849.
  68. Mekker A, Tchang VS, Haeberli L, Oxenius A, Trkola A, Karrer U. Immune senescence: relative contributions of age and cytomegalovirus infection. *PLoS Pathog.* 2012;8: e1002850.
  69. Lindau P, Mukherjee R, Gutschow MV, Vignali M, Warren EH, Riddell SR, et

- al. Cytomegalovirus Exposure in the Elderly Does Not Reduce CD8 T Cell Repertoire Diversity. *J Immunol.* 2019;202: 476–483.
70. Smithey MJ, Renkema KR, Rudd BD, Nikolich-Zugich J. Increased apoptosis, curtailed expansion and incomplete differentiation of CD8<sup>+</sup> T cells combine to decrease clearance of *L. monocytogenes* in old mice. *Eur J Immunol.* 2011;41: 1352–1364.
  71. Lang A, Nikolich-Zugich J. Functional CD8 T cell memory responding to persistent latent infection is maintained for life. *J Immunol.* 2011;187: 3759–3768.
  72. Miller RA. Effect of aging on T lymphocyte activation. *Vaccine.* 2000;18: 1654–1660.
  73. Nikolich-Zugich J, Li G, Uhrlaub JL, Renkema KR, Smithey MJ. Age-related changes in CD8 T cell homeostasis and immunity to infection. *Semin Immunol.* 2012;24: 356–364.
  74. Haynes L, Swain SL. Aged-related shifts in T cell homeostasis lead to intrinsic T cell defects. *Semin Immunol.* 2012;24: 350–355.
  75. Miller RA, Berger SB, Burke DT, Galecki A, Garcia GG, Harper JM, et al. T cells in aging mice: genetic, developmental, and biochemical analyses. *Immunol Rev.* 2005;205: 94–103.
  76. Clise-Dwyer K, Huston GE, Buck AL, Duso DK, Swain SL. Environmental and intrinsic factors lead to antigen unresponsiveness in CD4(+) recent thymic emigrants from aged mice. *J Immunol.* 2007;178: 1321–1331.
  77. Haynes L, Eaton SM, Swain SL. The defects in effector generation associated with aging can be reversed by addition of IL-2 but not other related gamma(c)-receptor binding cytokines. *Vaccine.* 2000;18: 1649–1653.
  78. Haynes L, Eaton SM, Burns EM, Rincon M, Swain SL. Inflammatory cytokines overcome age-related defects in CD4 T cell responses in vivo. *J Immunol.* 2004;172: 5194–5199.
  79. Brien JD, Uhrlaub JL, Hirsch A, Wiley CA, Nikolich-Zugich J. Key role of T cell defects in age-related vulnerability to West Nile virus. *J Exp Med.* 2009;206: 2735–2745.
  80. Messaoudi I, Warner J, Nikolich-Zugich D, Fischer M, Nikolich-Zugich J. Molecular, cellular, and antigen requirements for development of age-associated T cell clonal expansions in vivo. *J Immunol.* 2006;176: 301–308.
  81. Messaoudi I, Lemaoult J, Guevara-Patino JA, Metzner BM, Nikolich-Zugich J. Age-related CD8 T cell clonal expansions constrict CD8 T cell repertoire and have the potential to impair immune defense. *J Exp Med.* 2004;200: 1347–1358.
  82. Kohlmeier JE, Connor LM, Roberts AD, Cookenham T, Martin K, Woodland DL. Nonmalignant clonal expansions of memory CD8<sup>+</sup> T cells that arise with

- age vary in their capacity to mount recall responses to infection. *J Immunol.* 2010;185: 3456–3462.
83. Nikolich-Zugich J, Rudd BD. Immune memory and aging: an infinite or finite resource? *Curr Opin Immunol.* 2010;22: 535–540.
  84. Kapasi ZF, Murali-Krishna K, McRae ML, Ahmed R. Defective generation but normal maintenance of memory T cells in old mice. *Eur J Immunol.* 2002;32: 1567–1573.
  85. Valkenburg SA, Venturi V, Dang THY, Bird NL, Doherty PC, Turner SJ, et al. Early priming minimizes the age-related immune compromise of CD8<sup>+</sup> T cell diversity and function. *PLoS Pathog.* 2012;8: e1002544.
  86. Haynes L, Eaton SM, Burns EM, Randall TD, Swain SL. CD4 T cell memory derived from young naive cells functions well into old age, but memory generated from aged naive cells functions poorly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100: 15053–15058.
  87. Hammarlund E, Lewis MW, Hansen SG, Strelow LI, Nelson JA, Sexton GJ, et al. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat Med.* 2003;9: 1131–1137.
  88. Hammarlund E, Lewis MW, Carter SV, Amanna I, Hansen SG, Strelow LI, et al. Multiple diagnostic techniques identify previously vaccinated individuals with protective immunity against monkeypox. *Nat Med.* 2005;11: 1005–1011.
  89. Agius E, Lacy KE, Vukmanovic-Stejic M, Jagger AL, Papageorgiou A-P, Hall S, et al. Decreased TNF-alpha synthesis by macrophages restricts cutaneous immunosurveillance by memory CD4<sup>+</sup> T cells during aging. *J Exp Med.* 2009;206: 1929–1940.
  90. Richner JM, Gmyrek GB, Govero J, Tu Y, van der Windt GJW, Metcalf TU, et al. Age-Dependent Cell Trafficking Defects in Draining Lymph Nodes Impair Adaptive Immunity and Control of West Nile Virus Infection. *PLoS Pathog.* 2015;11: e1005027.
  91. Po JLZ, Gardner EM, Anaraki F, Katsikis PD, Murasko DM. Age-associated decrease in virus-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes during primary influenza infection. *Mech Ageing Dev.* 2002;123: 1167–1181.
  92. Miller RA, Stutman O. Limiting dilution analysis of IL-2 production: studies of age, genotype, and regulatory interactions. *Lymphokine Res.* 1982;1: 79–86.
  93. Haynes L, Linton PJ, Eaton SM, Tonkonogy SL, Swain SL. Interleukin 2, but not other common gamma chain-binding cytokines, can reverse the defect in generation of CD4 effector T cells from naive T cells of aged mice. *J Exp Med.* 1999;190: 1013–1024.
  94. Haynes L, Maue AC. Effects of aging on T cell function. *Curr Opin Immunol.* 2009;21: 414–417.
  95. Hasegawa A, Miki T, Hosokawa H, Hossain MB, Shimizu C, Hashimoto K, et



- al. Impaired GATA3-dependent chromatin remodeling and Th2 cell differentiation leading to attenuated allergic airway inflammation in aging mice. *J Immunol.* 2006;176: 2546–2554.
96. Tesar BM, Du W, Shirali AC, Walker WE, Shen H, Goldstein DR. Aging augments IL-17 T-cell alloimmune responses. *Am J Transplant.* 2009;9: 54–63.
97. Huang M-C, Liao J-J, Bonasera S, Longo DL, Goetzl EJ. Nuclear factor-kappaB-dependent reversal of aging-induced alterations in T cell cytokines. *FASEB J.* 2008;22: 2142–2150.
98. Lim M-A, Lee J, Park J-S, Jhun J-Y, Moon Y-M, Cho M-L, et al. Increased Th17 differentiation in aged mice is significantly associated with high IL-1 $\beta$  level and low IL-2 expression. *Exp Gerontol.* 2014;49: 55–62.
99. Raynor J, Lages CS, Shehata H, Hildeman DA, Chougnet CA. Homeostasis and function of regulatory T cells in aging. *Curr Opin Immunol.* 2012;24: 482–487.
100. Vukmanovic-Stejić M, Rustin MHA, Nikolich-Zugich J, Akbar AN. Immune responses in the skin in old age. *Curr Opin Immunol.* 2011;23: 525–531.
101. Schmitt V, Rink L, Uciechowski P. The Th17/Treg balance is disturbed during aging. *Exp Gerontol.* 2013;48: 1379–1386.
102. Lee JS, Lee W-W, Kim SH, Kang Y, Lee N, Shin MS, et al. Age-associated alteration in naive and memory Th17 cell response in humans. *Clin Immunol.* 2011;140: 84–91.
103. Behzad H, Huckriede ALW, Haynes L, Gentleman B, Coyle K, Wilschut JC, et al. GLA-SE, a Synthetic Toll-like Receptor 4 Agonist, Enhances T-Cell Responses to Influenza Vaccine in Older Adults. *J Infect Dis.* 2011;205: 466–473.
104. Zhang W, Brahmakshatriya V, Swain SL. CD4 T cell defects in the aged: Causes, consequences and strategies to circumvent. *Exp Gerontol.* 2014;54: 67–70.
105. Uhrlaub JL, Brien JD, Widman DG, Mason PW, Nikolich-Zugich J. Repeated in vivo stimulation of T and B cell responses in old mice generates protective immunity against lethal West Nile virus encephalitis. *J Immunol.* 2011;186: 3882–3891.
106. Ventevogel MS, Sempowski GD. Thymic rejuvenation and aging. *Curr Opin Immunol.* 2013;25: 516–522.
107. Egorov ES, Merzlyak EM, Shelenkov AA, Britanova OV, Sharonov GV, Staroverov DB, et al. Quantitative profiling of immune repertoires for minor lymphocyte counts using unique molecular identifiers. *J Immunol.* 2015;194: 6155–6163.
108. Mamedov IZ, Britanova OV, Zvyagin IV, Turchaninova MA, Bolotin DA,

- Putintseva EV, et al. Preparing unbiased T-cell receptor and antibody cDNA libraries for the deep next generation sequencing profiling. *Front Immunol.* 2013;4: 456.
109. Shugay M, Britanova OV, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Mamedov IZ, Tuganbaev TR, et al. Towards error-free profiling of immune repertoires. *Nat Methods.* 2014;11: 653–655.
110. Bolotin DA, Poslavsky S, Mitrophanov I, Shugay M, Mamedov IZ, Putintseva EV, et al. MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. *Nat Methods.* 2015;12: 380–381.
111. Shugay M, Bagaev DV, Turchaninova MA, Bolotin DA, Britanova OV, Putintseva EV, et al. VDJtools: Unifying Post-analysis of T Cell Receptor Repertoires. *PLoS Comput Biol.* 2015;11: e1004503.
112. Robins HS, Campregher PV, Srivastava SK, Wachter A. Comprehensive assessment of T-cell receptor  $\beta$ -chain diversity in  $\alpha\beta$  T cells. *Blood.* 2009; Available: <http://www.bloodjournal.org/content/114/19/4099?variant=long>
113. Freeman JD, Warren RL, Webb JR, Nelson BH, Holt RA. Profiling the T-cell receptor beta-chain repertoire by massively parallel sequencing. *Genome Res.* 2009;19: 1817–1824.
114. Mamedov IZ, Britanova OV, Bolotin DA, Chkalina AV, Staroverov DB, Zvyagin IV, et al. Quantitative tracking of T cell clones after haematopoietic stem cell transplantation. *EMBO Mol Med.* 2011;3: 201–207.
115. Warren RL, Freeman JD, Zeng T, Choe G, Munro S, Moore R, et al. Exhaustive T-cell repertoire sequencing of human peripheral blood samples reveals signatures of antigen selection and a directly measured repertoire size of at least 1 million clonotypes [Internet]. *Genome Research.* 2011. pp. 790–797. doi:10.1101/gr.115428.110
116. Vollmers C, Sit RV, Weinstein JA, Dekker CL, Quake SR. Genetic measurement of memory B-cell recall using antibody repertoire sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110: 13463–13468.
117. Jiang N, He J, Weinstein JA, Penland L, Sasaki S, He X-S, et al. Lineage structure of the human antibody repertoire in response to influenza vaccination. *Sci Transl Med.* 2013;5: 171ra19.
118. Laserson U, Vigneault F, Gadala-Maria D, Yaari G, Uduman M, Vander Heiden JA, et al. High-resolution antibody dynamics of vaccine-induced immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111: 4928–4933.
119. Kaplinsky J, Li A, Sun A, Coffre M, Koralov SB, Arnaout R. Antibody repertoire deep sequencing reveals antigen-independent selection in maturing B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111: E2622–9.
120. Robins HS, Srivastava SK, Campregher PV, Turtle CJ, Andriesen J, Riddell SR, et al. Overlap and effective size of the human CD8<sup>+</sup> T cell receptor

repertoire. *Sci Transl Med.* 2010;2: 47ra64.

121. Quigley MF, Greenaway HY, Venturi V, Lindsay R, Quinn KM, Seder RA, et al. Convergent recombination shapes the clonotypic landscape of the naive T-cell repertoire. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107: 19414–19419.
122. Shugay M, Bolotin DA, Putintseva EV, Pogorelyy MV, Mamedov IZ, Chudakov DM. Huge Overlap of Individual TCR Beta Repertoires. *Front Immunol.* 2013;4: 466.
123. Putintseva EV, Britanova OV, Staroverov DB, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Shugay M, et al. Mother and child T cell receptor repertoires: deep profiling study. *Front Immunol.* 2013;4: 463.
124. Zvyagin IV, Pogorelyy MV, Ivanova ME, Komech EA, Shugay M, Bolotin DA, et al. Distinctive properties of identical twins' TCR repertoires revealed by high-throughput sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111: 5980–5985.
125. Venturi V, Quigley MF, Greenaway HY, Ng PC, Ende ZS, McIntosh T, et al. A mechanism for TCR sharing between T cell subsets and individuals revealed by pyrosequencing. *J Immunol.* 2011;186: 4285–4294.
126. Föhse L, Suffner J, Suhre K, Wahl B, Lindner C, Lee C-W, et al. High TCR diversity ensures optimal function and homeostasis of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2011;41: 3101–3113.
127. Estorninho M, Gibson VB, Kronenberg-Versteeg D, Liu Y-F, Ni C, Cerosaletti K, et al. A novel approach to tracking antigen-experienced CD4 T cells into functional compartments via tandem deep and shallow TCR clonotyping. *J Immunol.* 2013;191: 5430–5440.
128. Linnemann C, Heemskerk B, Kvistborg P, Kluin RJC, Bolotin DA, Chen X, et al. High-throughput identification of antigen-specific TCRs by TCR gene capture. *Nat Med.* 2013;19: 1534–1541.
129. Gros A, Robbins PF, Yao X, Li YF, Turcotte S, Tran E, et al. PD-1 identifies the patient-specific CD8<sup>+</sup> tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *J Clin Invest.* 2014;124: 2246–2259.
130. Matz M, Shagin D, Bogdanova E, Britanova O, Lukyanov S, Diatchenko L, et al. Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR. *Nucleic Acids Res.* 1999;27: 1558–1560.
131. Douek DC, Betts MR, Brenchley JM, Hill BJ, Ambrozak DR, Ngai K-L, et al. A novel approach to the analysis of specificity, clonality, and frequency of HIV-specific T cell responses reveals a potential mechanism for control of viral escape. *J Immunol.* 2002;168: 3099–3104.
132. Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108: 9530–9535.

133. Kivioja T, Vähärautio A, Karlsson K, Bonke M, Enge M, Linnarsson S, et al. Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers. *Nat Methods*. 2011;9: 72–74.
134. Ross MG, Russ C, Costello M, Hollinger A, Lennon NJ, Hegarty R, et al. Characterizing and measuring bias in sequence data. *Genome Biol*. 2013;14: R51.
135. Nguyen P, Ma J, Pei D, Obert C, Cheng C, Geiger TL. Identification of errors introduced during high throughput sequencing of the T cell receptor repertoire [Internet]. *BMC Genomics*. 2011. doi:10.1186/1471-2164-12-106
136. Bolotin DA, Mamedov IZ, Britanova OV, Zvyagin IV, Shagin D, Ustyugova SV, et al. Next generation sequencing for TCR repertoire profiling: platform-specific features and correction algorithms. *Eur J Immunol*. 2012;42: 3073–3083.
137. Bolotin DA, Shugay M, Mamedov IZ, Putintseva EV, Turchaninova MA, Zvyagin IV, et al. MiTCR: software for T-cell receptor sequencing data analysis. *Nat Methods*. 2013;10: 813–814.
138. Deakin CT, Deakin JJ, Ginn SL, Young P, Humphreys D, Suter CM, et al. Impact of next-generation sequencing error on analysis of barcoded plasmid libraries of known complexity and sequence. *Nucleic Acids Res*. 2014;42: e129.
139. Turchaninova MA, Britanova OV, Bolotin DA, Shugay M, Putintseva EV, Staroverov DB, et al. Pairing of T-cell receptor chains via emulsion PCR. *Eur J Immunol*. 2013;43: 2507–2515.
140. Mamedov IZ, Britanova OV, Chkalina AV, Staroverov DB, Amosova AL, Mishin AS, et al. Individual characterization of stably expanded T cell clones in ankylosing spondylitis patients. *Autoimmunity*. 2009;42: 525–536.
141. Day EK, Carmichael AJ, Ten Berge IJM. Rapid CD8<sup>+</sup> T cell repertoire focusing and selection of high-affinity clones into memory following primary infection with a persistent human virus: human .... *The Journal of*. 2007; Available: <http://www.jimmunol.org/content/179/5/3203.short>
142. Iancu EM, Corthesy P, Baumgaertner P, Devevre E, Voelter V, Romero P, et al. Clonotype selection and composition of human CD8 T cells specific for persistent herpes viruses varies with differentiation but is stable over time. *J Immunol*. 2009;183: 319–331.
143. Maini MK, Gudgeon N, Wedderburn LR, Rickinson AB, Beverley PC. Clonal expansions in acute EBV infection are detectable in the CD8 and not the CD4 subset and persist with a variable CD45 phenotype. *J Immunol*. 2000;165: 5729–5737.
144. Klarenbeek PL, Remmerswaal EBM, ten Berge IJM, Doorenspleet ME, van Schaik BDC, Esveldt REE, et al. Deep sequencing of antiviral T-cell responses to HCMV and EBV in humans reveals a stable repertoire that is maintained for

many years. *PLoS Pathog.* 2012;8: e1002889.

145. Carter MS, Doskow J, Morris P, Li S, Nhim RP, Sandstedt S, et al. A regulatory mechanism that detects premature nonsense codons in T-cell receptor transcripts in vivo is reversed by protein synthesis inhibitors in vitro. *J Biol Chem.* 1995;270: 28995–29003.
146. Wang J, Vock VM, Li S, Olivas OR, Wilkinson MF. A quality control pathway that down-regulates aberrant T-cell receptor (TCR) transcripts by a mechanism requiring UPF2 and translation. *J Biol Chem.* 2002;277: 18489–18493.
147. Bhalla AD, Gudikote JP, Wang J, Chan W-K, Chang Y-F, Olivas OR, et al. Nonsense codons trigger an RNA partitioning shift. *J Biol Chem.* 2009;284: 4062–4072.
148. Gardner LB. Hypoxic inhibition of nonsense-mediated RNA decay regulates gene expression and the integrated stress response. *Mol Cell Biol.* 2008;28: 3729–3741.
149. Soothill PW, Nicolaidis KH, Rodeck CH, Gamsu H. Blood gases and acid-base status of the human second-trimester fetus. *Obstet Gynecol.* 1986;68: 173–176.
150. Bhuvanagiri M, Schlitter AM, Hentze MW, Kulozik AE. NMD: RNA biology meets human genetic medicine. *Biochem J.* 2010;430: 365–377.
151. Bruno IG, Karam R, Huang L, Bhardwaj A, Lou CH, Shum EY, et al. Identification of a microRNA that activates gene expression by repressing nonsense-mediated RNA decay. *Mol Cell.* 2011;42: 500–510.
152. Feeney AJ. Lack of N regions in fetal and neonatal mouse immunoglobulin V-D-J junctional sequences. *J Exp Med.* 1990;172: 1377–1390.
153. Bogue M, Gilfillan S, Benoist C, Mathis D. Regulation of N-region diversity in antigen receptors through thymocyte differentiation and thymus ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89: 11011–11015.
154. George JF Jr, Schroeder HW Jr. Developmental regulation of D beta reading frame and junctional diversity in T cell receptor-beta transcripts from human thymus. *J Immunol.* 1992;148: 1230–1239.
155. Cherrier M, Cardona A. Substantial N diversity is generated in T cell receptor  $\alpha$  genes at birth despite low levels of terminal deoxynucleotidyl transferase expression in mouse thymus. *European journal of.* 2002; Available:
156. Elhanati Y, Murugan A, Callan CG Jr, Mora T, Walczak AM. Quantifying selection in immune receptor repertoires. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111: 9875–9880.
157. Yan J, Greer JM, Hull R, O’Sullivan JD, Henderson RD, Read SJ, et al. The effect of ageing on human lymphocyte subsets: comparison of males and females. *Immun Ageing.* 2010;7: 4.
158. Fülöp T, Larbi A, Pawelec G. Human T cell aging and the impact of persistent viral infections. *Front Immunol.* 2013;4: 271.

159. Miyazawa S, Jernigan RL. Residue-residue potentials with a favorable contact pair term and an unfavorable high packing density term, for simulation and threading. *J Mol Biol.* 1996;256: 623–644.
160. Kosmrlj A, Jha AK, Huseby ES, Kardar M, Chakraborty AK. How the thymus designs antigen-specific and self-tolerant T cell receptor sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105: 16671–16676.
161. Chakrabarti P, Bhattacharyya R. Geometry of nonbonded interactions involving planar groups in proteins. *Prog Biophys Mol Biol.* 2007;95: 83–137.
162. Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol.* 1982;157: 105–132.
163. Myers DR, Zikherman J, Roose JP. Tonic Signals: Why Do Lymphocytes Bother? *Trends Immunol.* 2017;38: 844–857.
164. Kilpatrick RD, Rickabaugh T, Jamieson BD. Response to Comment on “Homeostasis of the Naive CD4+ T Cell Compartment during Aging.” *The Journal of Immunology.* 2008;180: 6437–6437.
165. van den Broek T, Borghans JAM, van Wijk F. The full spectrum of human naive T cells. *Nat Rev Immunol.* 2018;18: 363–373.
166. Nguyen P, Liu W, Ma J, Manirarora JN. Discrete TCR repertoires and CDR3 features distinguish effector and Foxp3+ regulatory T lymphocytes in myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental .... *The Journal of.* 2010; Available: <https://www.jimmunol.org/content/185/7/3895.short>
167. Liu X, Nguyen P, Liu W, Cheng C, Steeves M, Obenauer JC, et al. T Cell Receptor CDR3 Sequence but Not Recognition Characteristics Distinguish Autoreactive Effector and Foxp3+ Regulatory T Cells. *Immunity.* 2009;31: 909–920.
168. Izraelson M, Nakonechnaya TO, Moltedo B, Egorov ES, Kasatskaya SA, Putintseva EV, et al. Comparative analysis of murine T-cell receptor repertoires. *Immunology.* 2018;153: 133–144.
169. Bolotin DA, Poslavsky S, Davydov AN, Frenkel FE, Fanchi L, Zolotareva OI, et al. Antigen receptor repertoire profiling from RNA-seq data. *Nat Biotechnol.* 2017;35: 908–911.
170. Stefanová I, Dorfman JR, Germain RN. Self-recognition promotes the foreign antigen sensitivity of naive T lymphocytes. *Nature.* 2002;420: 429–434.
171. Fulton RB, Hamilton SE, Xing Y, Adam Best J, Goldrath AW, Hogquist KA, et al. The TCR’s sensitivity to self-peptide–MHC dictates the ability of naive CD8 T cells to respond to foreign antigens [Internet]. *Nature Immunology.* 2015. pp. 107–117. doi:10.1038/ni.3043
172. Mandl JN, Monteiro JP, Vriskoop N, Germain RN. T cell-positive selection uses self-ligand binding strength to optimize repertoire recognition of foreign antigens. *Immunity.* 2013;38: 263–274.

173. Goronzy JJ, Fang F, Cavanagh MM, Qi Q, Weyand CM. Naive T cell maintenance and function in human aging. *J Immunol*. 2015;194: 4073–4080.
174. Venturi V, Price DA, Douek DC, Davenport MP. The molecular basis for public T-cell responses? *Nat Rev Immunol*. 2008;8: 231–238.
175. Murugan A, Mora T, Walczak AM, Callan CG Jr. Statistical inference of the generation probability of T-cell receptors from sequence repertoires. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109: 16161–16166.
176. Pogorelyy MV, Elhanati Y, Marcou Q, Sycheva AL, Komech EA, Nazarov VI, et al. Persisting fetal clonotypes influence the structure and overlap of adult human T cell receptor repertoires. *PLoS Comput Biol*. 2017;13: e1005572.
177. Mold JE, Venkatasubrahmanyam S, Burt TD, Michaëlsson J, Rivera JM, Galkina SA, et al. Fetal and adult hematopoietic stem cells give rise to distinct T cell lineages in humans. *Science*. 2010;330: 1695–1699.
178. Kumar BV, Connors TJ, Farber DL. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity*. 2018;48: 202–213.
179. Thome JJC, Grinshpun B, Kumar BV, Kubota M, Ohmura Y, Lerner H, et al. Longterm maintenance of human naive T cells through in situ homeostasis in lymphoid tissue sites. *Sci Immunol*. 2016;1. doi:10.1126/sciimmunol.aah6506
180. Egorov ES, Kasatskaya SA, Zubov VN, Izraelson M, Nakonechnaya TO, Staroverov DB, Angius A, Cucca F, Mamedov IZ, Rosati E, Franke A, Shugay M, Pogorelyy MV, Chudakov DM, Britanova OV. The Changing Landscape of Naive T Cell Receptor Repertoire With Human Aging. *Front Immunol*. 2018 Jul 24;9:1618. doi: 10.3389/fimmu.2018.01618.
181. Li N, van Unen V, Abdelaal T, Guo N, Kasatskaya SA, Ladell K, McLaren JE, Egorov ES, Izraelson M, Chuva de Sousa Lopes SM, Höllt T, Britanova OV, Eggermont J, de Miranda NFCC, Chudakov DM, Price DA, Lelieveldt BPF, Koning F. Memory CD4<sup>+</sup> T cells are generated in the human fetal intestine. *Nat Immunol*. 2019 Mar;20(3):301-312. doi: 10.1038/s41590-018-0294-9.
182. Shugay M, Bagaev DV, Zvyagin IV, Vroomans RM, Crawford JC, Dolton G, Komech EA, Sycheva AL, Koneva AE, Egorov ES, Eliseev AV, Van Dyk E, Dash P, Attaf M, Rius C, Ladell K, McLaren JE, Matthews KK, Clemens EB, Douek DC, Luciani F, van Baarle D, Kedzierska K, Kesmir C, Thomas PG, Price DA, Sewell AK, Chudakov DM. VDJdb: a curated database of T-cell receptor sequences with known antigen specificity. *Nucleic Acids Res*. 2018 Jan 4;46(D1):D419-D427. doi: 10.1093/nar/gkx760.
183. Bagaev DV, Vroomans RMA, Samir J, Stervbo U, Rius C, Dolton G, Greenshields-Watson A, Attaf M, Egorov ES, Zvyagin IV, Babel N, Cole DK, Godkin AJ, Sewell AK, Kesmir C, Chudakov DM, Luciani F, Shugay M. VDJdb in 2019: database extension, new analysis infrastructure and a T-cell receptor motif compendium. *Nucleic Acids Res*. 2019 Oct 7. pii: gkz874. doi: 10.1093/nar/gkz874.