

На правах рукописи

Сычева Анастасия Леонидовна

**Клональная характеристика Т-клеточного ответа человека при  
иммунизации инактивированными вакцинами**

1.5.3 – Молекулярная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва - 2023

Работа выполнена в лаборатории сравнительной и функциональной геномики отдела геномики адаптивного иммунитета Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

**Научный руководитель:**

**Лебедев Юрий Борисович**, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией сравнительной и функциональной геномики отдела геномики адаптивного иммунитета Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

**Официальные оппоненты:**

**Апт Александр Соломонович**, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией иммуногенетики отдела иммунологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза».

**Храмева Екатерина Евгеньевна**, кандидат биологических наук, старший преподаватель Центра молекулярной и клеточной биологии Сколковского института науки и технологий.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН).

Защита состоится 4 октября 2023 года в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и на сайте института [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru).

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2023 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор физико-математических наук  
В.А. Олейников



## **Общая характеристика работы**

### **Актуальность темы исследования**

На сегодняшний день вакцинация – один из самых эффективных способов борьбы с инфекциями, поэтому на создание новых и улучшение уже имеющихся вакцин направлены значительные ресурсы. Для каждой новой вакцины требуется проверка её иммуногенности, и до недавнего времени основным проверяемым параметром был титр нейтрализующих антител. Однако, в борьбе с патогенами помимо антител участвуют и Т-клетки, которые играют важную роль в элиминации вирусных возбудителей и формировании долговременной иммунной защиты. Таким образом, способность стимулировать Т-клеточный иммунитет является не менее значимым критерием в оценке иммуногенности вакцины.

Поскольку антиген-специфичный Т-клеточный ответ основан на активации и экспансии отдельных Т-клеточных клонов (Т-клеток с идентичным антиген-распознающим Т-клеточным рецептором), то любые изменения численности и фенотипических свойств отвечающих Т-клеточных клонов скажутся и на репертуаре Т-клеточных рецепторов (англ. *T cell receptor*, TCR). Благодаря развитию технологии высокопроизводительного секвенирования стало возможным глубокое профилирование репертуара TCR всех присутствующих в образце Т-клеток или предварительно выделенных субпопуляций, что позволяет отслеживать даже незначительные изменения в Т-клеточном иммунитете.

Для изучения особенностей Т-клеточного ответа на инактивированные вакцины методом высокопроизводительного секвенирования мы выбрали две уже одобренные и широко применяемые вакцины против гриппа и клещевого энцефалита. Однако, несмотря на доказанную эффективность, в обоих случаях требуется регулярная ревакцинация для поддержания защитного иммунитета на протяжении всей жизни. Кроме того, известны случаи прорывных инфекций, которые могут приводить к серьёзным осложнениям и даже смерти. Новые данные об особенностях Т-клеточного ответа и формировании иммунологической памяти помогут лучше понять механизмы, лежащие в основе действия выбранных вакцин, и в дальнейшем могут способствовать улучшению современных протоколов иммунизации или созданию новых вакцин.

### **Цель работы и основные задачи исследования**

**Целью** работы является изучение динамики, фенотипических свойств и клонального состава Т-клеточного ответа на вакцины против гриппа и клещевого энцефалита.

Для этого были поставлены следующие задачи:

- 1) получить библиотеки и реконструировать репертуары κДНК β-цепей TCR из образцов периферической крови здоровых доноров до и после вакцинации против гриппа или клещевого энцефалита;
- 2) с помощью статистических методов идентифицировать вакцин-ассоциированные Т-клеточные клоны и изучить особенности их динамики в ходе вакцинации;
- 3) используя репертуары κДНК β-цепей TCR отдельных субпопуляций охарактеризовать фенотипические свойства Т-клеток вакцин-ассоциированных клонов;
- 4) изучить особенности формирования Т-клеточной памяти в ответ на вакцинацию;
- 5) выполнить сравнительный анализ аминокислотных последовательностей антиген-распознающих участков β-цепей TCR вакцин-ассоциированных клонов.

### **Научная новизна и научно-практическая значимость работы**

В проведенном исследовании впервые был изучен Т-клеточный ответ на вакцины против гриппа и клещевого энцефалита на уровне отдельных клонов. В каждом случае мы показали экспансию вакцин-ассоциированных клонов и формирование иммунологической памяти в результате вакцинации. Благодаря глубокому секвенированию репертуаров β-цепей TCR мы смогли отследить изменения представленности сотен клонов и выделить несколько волн клональной экспансии в ответ на двухэтапную вакцинацию против клещевого энцефалита (КЭ). Каждой волне были свойственны разные скорость и сила экспансии, а также разный вклад в образование новых Т-клеток памяти. По результатам фенотипического анализа было выявлено преобладание CD4<sup>+</sup> Т-клеточного ответа на обе инактивированные вакцины. Но при этом мы впервые показали, что вакцина против КЭ способна индуцировать CD8<sup>+</sup> Т-клеточный ответ.

Также мы показали образование десятков кластеров клонов с похожей антигенной специфичностью у доноров, вакцинированных против КЭ. Кластеры были образованы как среди клонов одного донора, так и между разными донорами. В первом случае мы получили свидетельство конвергентной селекции вакцин-ассоциированных клонов с большим диапазоном антигенной специфичности, а во втором – общие мотивы клонов, вероятно специфичных к иммунодоминантным эпитопам вируса КЭ, что в сочетании с известными аллелями HLA для каждого донора может помочь в создании первых мультимеров с антигенами вируса КЭ.

### **Положения, выносимые на защиту**

- 1) Иммунизация субъединичной вакциной против гриппа и инактивированной цельновирионной вакциной против клещевого энцефалита вызывает продолжительный выраженный Т-клеточный ответ.

- 2) В результате вакцинация против гриппа и клещевого энцефалита происходит формирование новых Т-клеток памяти.
- 3) Т-клеточный ответ на двухэтапную вакцинацию против клещевого энцефалита состоит из нескольких волн клональной экспансии, Т-клетки которых вносят разный вклад в формирование иммунологической памяти.
- 4) Кластерный анализ показал широкий спектр антигенной специфичности клонов, ассоциированных с ответом на вакцину против клещевого энцефалита.
- 5) Общие мотивы, образованные вакцин-ассоциированными клонами, свидетельствуют о наличии иммунодоминантных эпитопов в составе вакцины против клещевого энцефалита.

### **Апробация результатов и публикации.**

Основные результаты диссертационной работы были представлены на семи всероссийских и международных конференциях в формате устных и стендовых докладов, также по теме работы было опубликовано 6 статей в рецензируемых научных журналах, входящих в базы данных Scopus и Web of Science.

### **Объем и структура диссертационной работы.**

Диссертация изложена на 103 страницах и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, благодарности, список сокращений и список литературы. Материал проиллюстрирован 35 рисунками и 2 таблицами, а также дополнен 3 приложениями. Библиографический указатель включает ссылки на 172 источника.

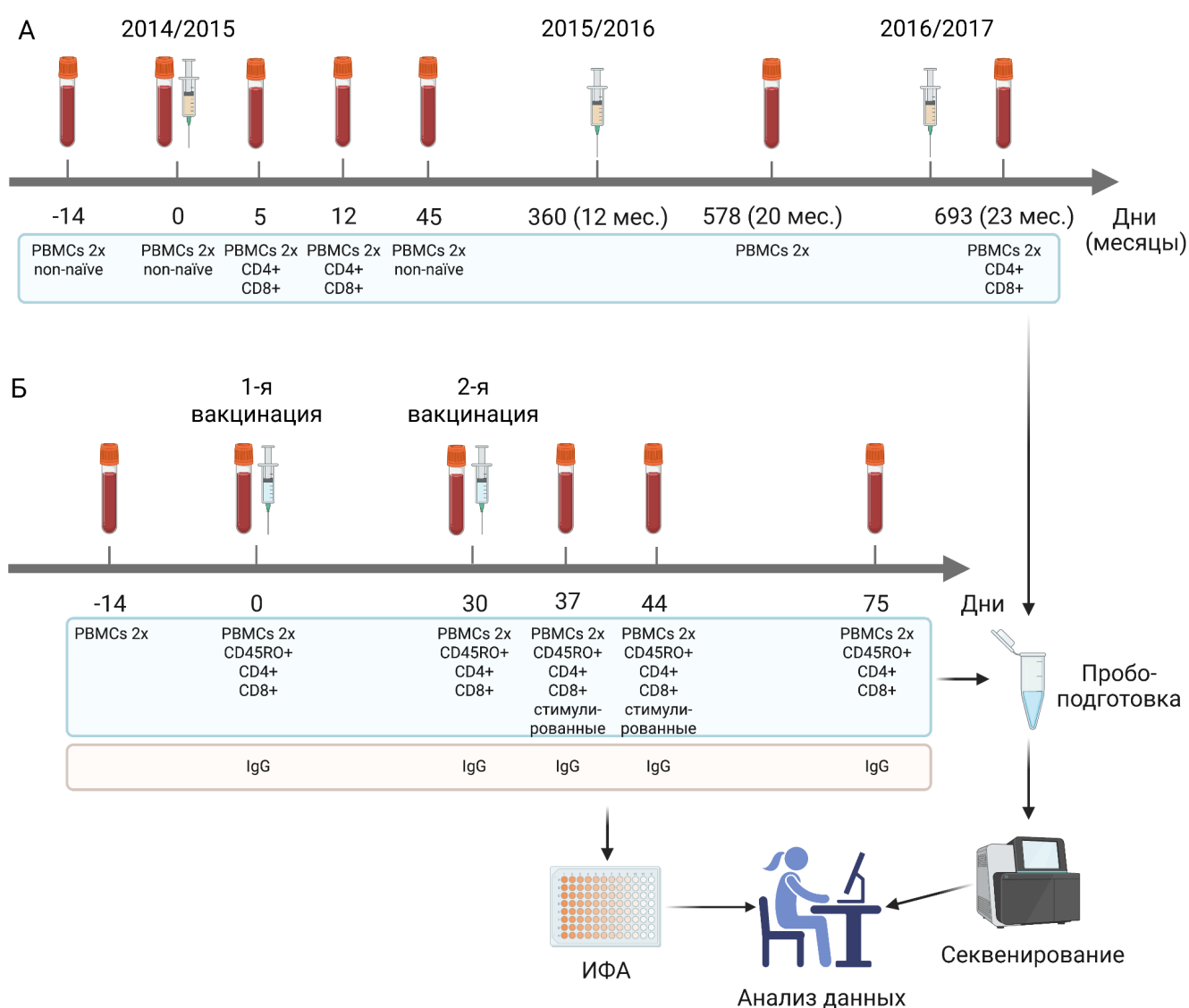
## **Содержание работы**

### **1. Сбор образцов и получение репертуаров $\beta$ -цепей TCR**

В первом исследовании участвовал один донор (мужчина, 58 лет), который в течение трёх лет ежегодно прививался сезонной вакциной против гриппа Inﬂuvac<sup>®</sup> (2014/2015, 2015/2016 и 2016/2017). Второе – включало в себя 11 доноров: 7 женщин и 4 мужчин, в возрасте от 24 до 60 лет (медиана 27 лет,  $Q_1 = 25 - Q_3 = 32$ ), каждый из которых дважды был иммунизирован вакциной против КЭ Клещ-Э-Вак<sup>®</sup> с интервалом в 30 дней. До и после вакцинации были получены образцы периферической крови в соответствии со схемой на Рисунке 1. В каждой временной точке были выделены парные фракции моноклеарных клеток периферической крови (PBMCs), дополнительные аликвоты были использованы для выделения  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD45RO^+$  и “non-naïve” ( $CD45RO^+$ ,  $CD56^+$ ,  $CD57^+$  и  $CD244^+$ ) Т-клеток. Для двух доноров, получивших вакцину против КЭ, на 37-й и 44-й дни часть PBMCs была использована

для *in vitro* стимуляции инактивированными очищенными частицами вируса КЭ с последующим выделением Т-клеток, экспрессирующих CD137 или продуцирующих IFN $\gamma$ . Также для всех доноров, привитых против КЭ, была измерена концентрация специфичных к вирусу КЭ IgG в сыворотке крови.

Тотальная РНК, выделенная из каждого образца, была использована для приготовления библиотек кДНК  $\beta$ -цепей TCR с помощью оригинального протокола пробоподготовки, затем полученные библиотеки были секвенированы на платформе Illumina. В результате первичной обработки данных секвенирования для всех образцов были реконструированы репертуары  $\beta$ -цепей TCR.



**Рисунок 1.** Расписание вакцинации и забора образцов крови для доноров, вакцинированных против гриппа (А) и против КЭ (Б). Для каждой временной точки указаны выделенные в этот день субпопуляции клеток, на основе которых потом были приготовлены и секвенированы библиотеки кДНК  $\beta$ -цепей TCR. Для доноров, получивших вакцину против КЭ, также была определена концентрация специфичных к вирусу КЭ IgG в сыворотке крови методом ИФА.

## 2. Изучение Т-клеточного ответа на противогриппозную вакцинацию

### 2.1. Анализ вакцин-индуцированной клональной экспансии

Для оценки влияния противогриппозной вакцины на отдельные клоны Т-клеток мы сравнили полные репертуары  $\beta$ -цепей TCR до и после вакцинации с помощью инструментов пакета edgeR. Поскольку наблюдаемые изменения в репертуарах могут быть связаны не только с реальными иммунологическими процессами, но и со случайной вариабельностью, возникающей в результате отбора проб и в процессе пробоподготовки, мы предварительно оценили разброс клональной представленности между биологическими репликами PBMCs в каждой временной точке. Затем попарно сравнили репертуары разных временных точек с помощью пермутационного (точного) теста.

В результате сравнения мы получили десятки клонов, представленность которых статистически значимо изменилась в 2 и более раза ( $p < 0,01$  после коррекции методом Бенджамини-Хохберга) между любыми двумя временными точками (левая часть Таблицы 1). При этом количество клонов, представленность которых изменилась до введения вакцины (день -14 vs день 0), оказалось сопоставимым с количеством клонов, выявленных при сравнении репертуаров, полученных после вакцинации, с репертуаром дня 0 (день 5 vs день 0, день 12 vs день 0, день 45 vs день 0). С другой стороны, мы обнаружили небольшое преобладание доли “растущих” клонов (представленность которых увеличилась со временем) в парах репертуара дня 12 с репертуарами предыдущих дней (день 12 vs день -14, день 12 vs день 0, день 12 vs день 5; правая часть Таблицы 1). Можно предположить, что смещение баланса к 12-му дню произошло в результате экспансии ответивших на вакцинацию клонов, но тем не менее, ответ был недостаточно сильным для того, чтобы вызвать существенные перестройки в репертуаре  $\beta$ -цепей TCR.

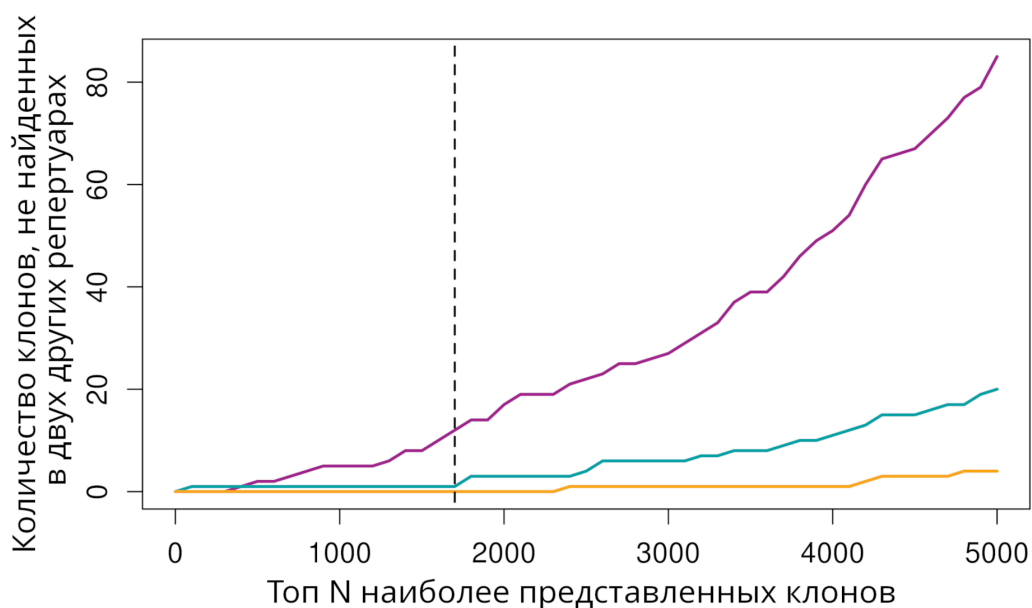
**Таблица 1.** Количество клонов, представленность которых статистически значимо изменилась между двумя временными точками.

	Количество клонов					Отношение “растущие” / “падающие”			
	День -14	День 0	День 5	День 12	День 45	День 0	День 5	День 12	День 45
День -14	0	30	63	41	89	1,00	0,64	<b>2,93</b>	1,17
День 0	30	0	31	36	57		1,00	<b>2,12</b>	1,63
День 5	99	31	0	54	49			<b>2,84</b>	1,40
День 12	14	17	19	0	29				1,32
День 45	76	35	35	22	0				

В левой части таблицы значения над диагональю соответствуют количеству “растущих” клонов, а под диагональю – “падающих”.

## 2.2. Обнаружение “новых” клонов среди “non-naïve” Т-клеток.

Поскольку антигенный состав противогриппозной вакцины ежегодно меняется, то даже в случае слабо выраженной клональной экспансии возможно появление новых клонов среди Т-клеток памяти, входящих в состав субпопуляции “non-naïve” Т-клеток. Для того, чтобы узнать приводит ли противогриппозная вакцинация к обогащению Т-клеток памяти новыми клонами, мы сравнили репертуар субпопуляции “non-naïve” Т-клеток, полученной через 1,5 месяца после вакцинации (день 45), с аналогичными репертуарами Т-клеток, собранных до вакцинации (дни -14 и 0). Перед сравнением каждый репертуар был отсортирован по клональной представленности (от большей к меньшей), после чего мы сформировали подмножества самых высокопредставленных клонов (топ-100, топ-200 и т.д.), при этом каждое следующее подмножество включало в себя предыдущее. Для каждого подмножества было определено количество уникальных (“новых”) клонов, которые отсутствовали в соответствующих подмножествах двух других репертуаров субпопуляций “non-naïve” Т-клеток (Рисунок 2, фиолетовая линия).



**Рисунок 2.** Количество уникальных клонов, найденных в каждом подмножестве наиболее высокопредставленных клонов для репертуаров “non-naïve” Т-клеток дня -14 (жёлтая линия), дня 0 (голубая линия) и дня 45 (фиолетовая линия). Вертикальная пунктирная линия обозначает подмножество с минимальным значением FDR (подробнее в тексте).

В результате сравнения мы ожидаемо увидели увеличение количества “новых” клонов с увеличением размера подмножества, что вероятно связано с влиянием случайных факторов на представленность клона при взятии образцов крови и дальнейшей пробоподготовке. Для того,

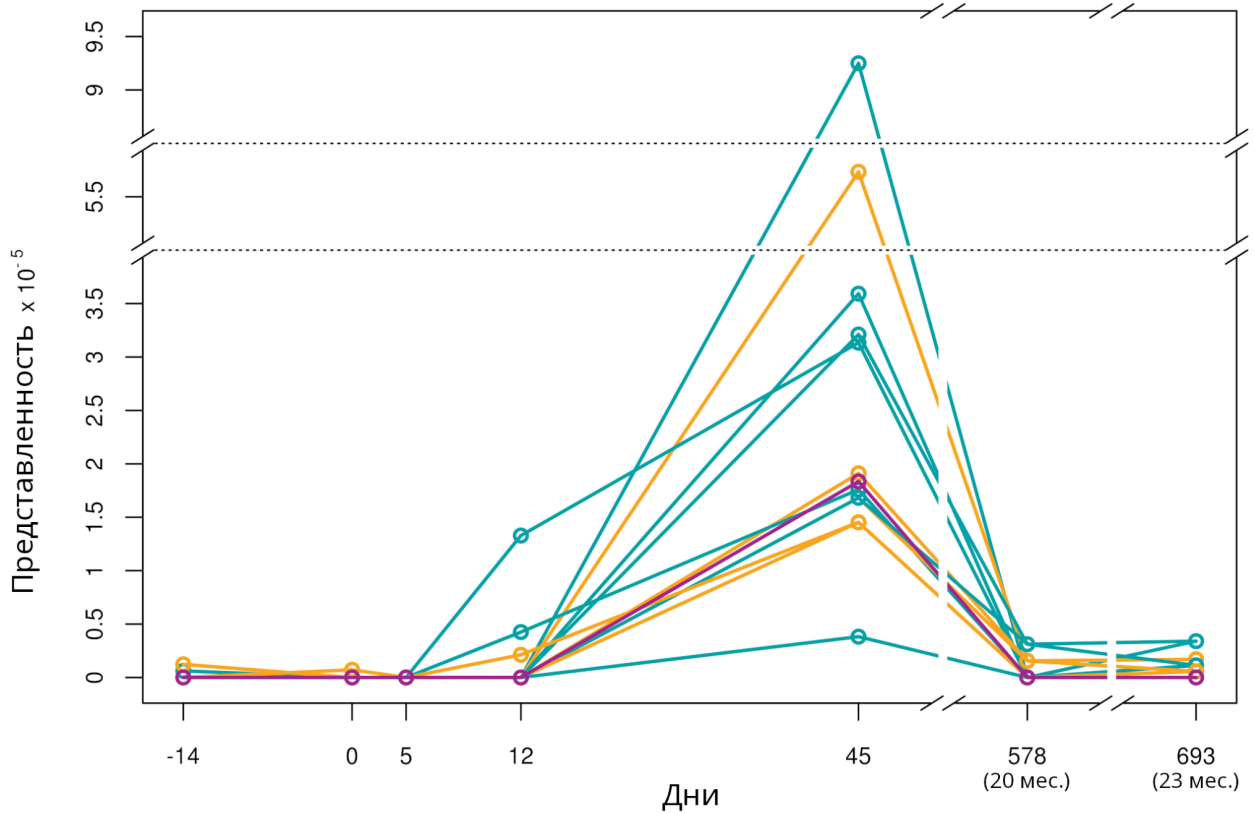


чтобы исключить случайную вариабельность, мы оценили количество уникальных клонов, которые были выявлены в подмножествах репертуаров дней -14 и 0, так как мы предполагаем, что до вакцинации иммунная система не была подвержена сильной стимуляции и в этом случае “новые” клоны можно считать “ложноположительным результатом” (Рисунок 2, жёлтая и голубая линии). Таким образом, мы получили возможность оценить долю “ложных” клонов, найденных репертуаре дня 45, как отношение числа уникальных клонов на день 0 или день -14 к числу уникальных клонов на день 45 того же подмножества (англ. *false discovery rate*, FDR). Минимальное значение FDR было получено для подмножества, содержащего 1700 наиболее высокопредставленных клонов (top-1700, вертикальная пунктирная линия на Рисунке 2). Среди этих клонов в репертуаре “non-naïve” Т-клеток 45-го дня было обнаружено 13 “новых” клонов, клетки которых могли приобрести фенотип Т-клеток памяти в результате противогриппозной вакцинации.

Далее мы проследили динамику изменения представленности выявленных клонов в репертуарах PBMCs до и после вакцинации (Рисунок 3). Только 3 из 13 “новых” клонов присутствовали в хотя бы в одном репертуаре PBMCs, полученных до вакцинации, где имели очень низкую представленность. Для всех клонов максимальная представленность была достигнута на день 45 после вакцинации, при этом для 8 из 13 клонов увеличение представленности оказалось достаточно выраженным для того, чтобы быть обнаруженными ещё и с помощью edgeR. В течение двух лет после первой иммунизации 9 из 13 клонов оставались на детектируемом уровне в образцах PBMCs, хотя повторные вакцинации не вызвали существенного увеличения их представленности.

Мы также определили фенотипические характеристики Т-клеток “новых” клонов: 7 из 13 были обнаружены в репертуарах  $\beta$ -цепей TCR CD4<sup>+</sup> Т-клеток и ещё 1 – CD8<sup>+</sup> Т-клеток, для 5 клонов статус остался неизвестным. Однако, несмотря на преобладание CD4<sup>+</sup> Т-клеточных клонов, полученное распределение не отличалось от фенотипического распределения для 1700 наиболее высокопредставленных клонов того же репертуара ( $p = 0,63$  для точного теста Фишера и  $p = 0,60$  для точного теста Барнарда).

Тем не менее, обнаружение “новых” клонов Т-клеток памяти с ярко выраженной экспансией после вакцинации является важным свидетельством в пользу того, что даже у взрослого индивида, который регулярно сталкивается с антигенами вируса гриппа, при каждой последующей вакцинации возможен рекрутинг новых клонов, их переход в субпопуляцию Т-клеток памяти и долговременное сохранение в организме. Таким образом, каждый раз происходит обновление противогриппозного иммунитета.



**Рисунок 3.** Динамика изменения представленности “новых” клонов, обнаруженных в репертуаре “non-naïve” Т-клеток 45-го дня. Голубым цветом обозначены  $CD4^+$  Т-клеточные клоны, фиолетовым –  $CD8^+$  Т-клеточные клоны, жёлтым – клоны, для Т-клеток которых фенотип не определён.

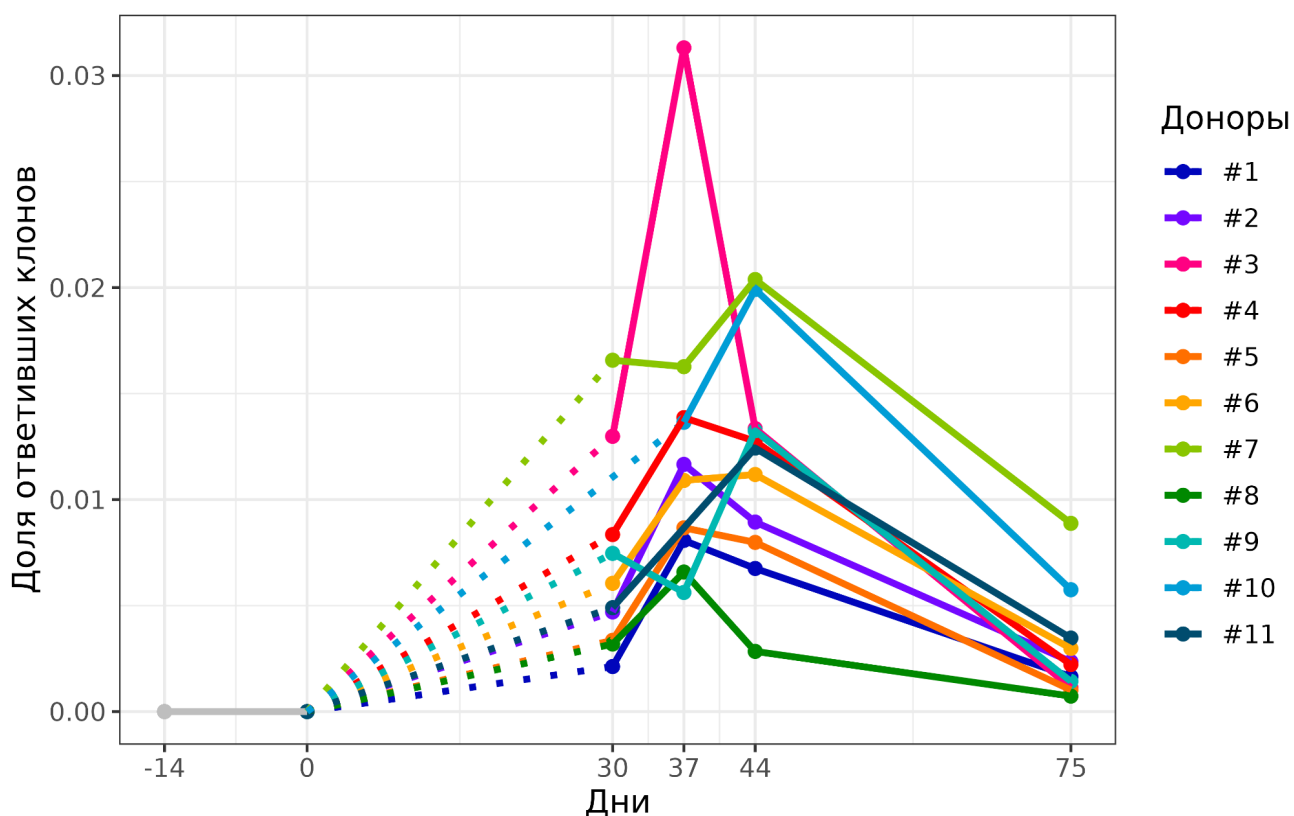
### 3. Изучение Т-клеточного ответа на вакцину против КЭ

#### 3.1. Поиск вакцин-ассоциированных клонов и анализ их динамики

Для изучения Т-клеточного ответа на вакцину против КЭ мы применили тот же подход, что был описан выше для противогриппозной вакцинации: сравнили репертуары  $\beta$ -цепей TCR до и после введения вакцины с помощью инструментов edgeR, а для учёта случайных факторов, влияющих на клональную представленность, использовали репертуары биологических реплик PBMCs в каждой временной точке. В результате сравнения репертуаров разных временных точек было выявлено от 302 до 1706 вакцин-ассоциированных клонов для каждого донора, представленность которых увеличилась в 32 и более раза ( $p < 0,01$  после коррекции методом Бенджамини-Хохберга) и которые отсутствовали в репертуарах  $\beta$ -цепей TCR PBMCs, полученных до вакцинации.

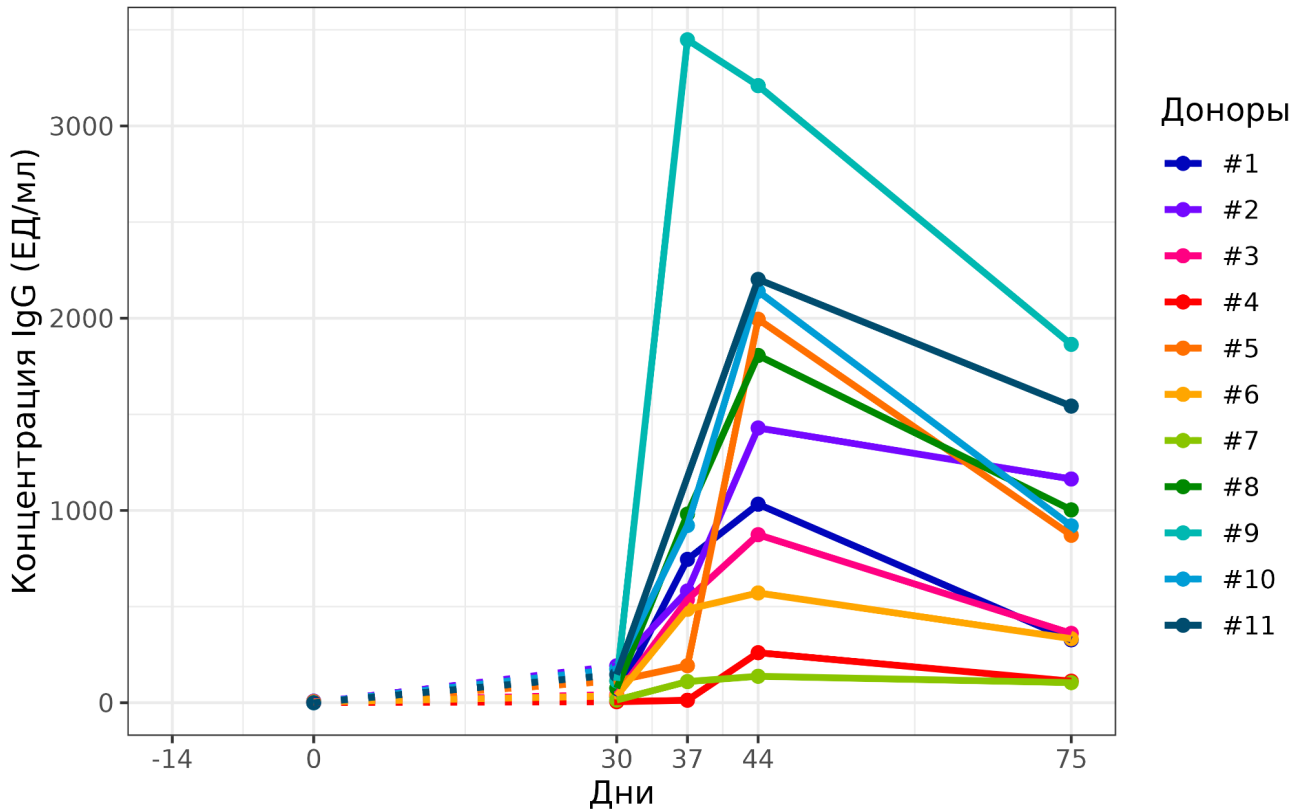
Для всех доноров мы проследили общую динамику изменения представленности вакцин-ассоциированных клонов в репертуаре PBMCs. Ответившие клоны суммарно занимали до 3,1% репертуара на пике экспансии, что свидетельствует о сильном Т-клеточном ответе на вакцинацию против КЭ (Рисунок 4). Вместе с тем, мы выделили два основных паттерна

клональной экспансии: клоны доноров #1–5, 8 демонстрировали максимальную суммарную представленность на день 37, в то время как клоны доноров #6, 7, 9–11 – на день 44. У двух доноров (#7 и #9) также был обнаружен небольшой пик на день 30. Вероятно, полученные различия могут быть следствием индивидуальных особенностей развития Т-клеточного ответа на двухэтапную вакцинацию. В связи с этим при изучении иммунного ответа на вакцины со сложной схемой иммунизации целесообразно включать в анализ несколько временных точек после введения второй и последующих вакцин.



**Рисунок 4.** Динамика изменения суммарной представленности вакцин-ассоциированных клонов в репертуаре  $\beta$ -цепей TCR PBMCs. Представленность каждого клона рассчитывалась как среднее значение по двум репликам PBMCs.

В то же время, динамика концентрации IgG, специфичных к вирусу КЭ, была одинаковой практически у всех доноров и достигла наибольшего значения через две недели после второй вакцинации (день 44, Рисунок 5). Такое расхождение с динамикой представленности Т-клеточных клонов указывает на то, что антительный ответ не отражает индивидуальные особенности адаптивного иммунного ответа на вакцину против КЭ, и ещё раз подчёркивает необходимость комплексного подхода при изучении влияния вакцины на иммунитет.

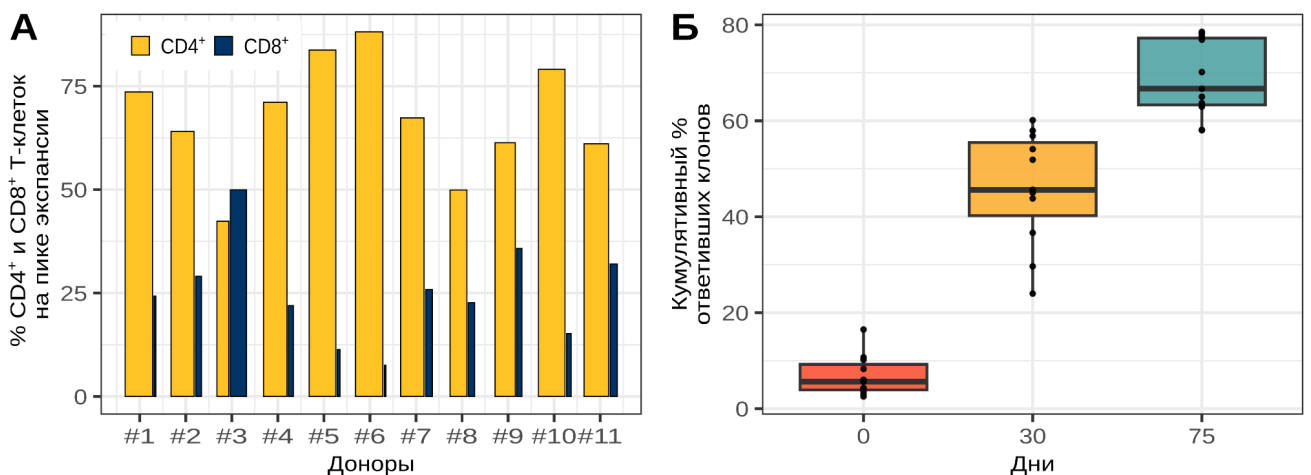


**Рисунок 5.** Динамика изменения концентрации IgG, специфичных к вирусу КЭ.

### 3.2. Фенотипические особенности Т-клеток вакцин-ассоциированных клонов

Для того, чтобы получить общие представления о функциональных свойствах Т-клеток ответивших клонов, мы оценили их присутствие в репертуарах  $\beta$ -цепей TCR различных фенотипических субпопуляций Т-клеток. Сравнив репертуары  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток, мы смогли определить принадлежность Т-клеток вакцин-ассоциированных клонов к соответствующим субпопуляциям. Соотношение  $CD4^+/CD8^+$  Т-клеточных клонов, ассоциированных с вакцинацией, практически для всех доноров было значительно смещено в сторону  $CD4^+$  как по доли клонов, так и по доли представленности на пике Т-клеточного ответа (Рисунок 6А). Только для донора #3 мы наблюдали сопоставимую экспансию в обеих подмножествах с небольшим преобладанием  $CD8^+$  Т-клеточных клонов. Тем не менее, у остальных доноров экспансия  $CD8^+$  Т-клеточных клонов оказалась достаточно выраженной для того, чтобы превысить 32-кратный порог, и на пике экспансии суммарно занять до 0,53% репертуара  $\beta$ -цепей TCR РВМС. Таким образом, в этой работе мы впервые показали, что инактивированная вакцина против КЭ способна стимулировать  $CD8^+$  Т-клеточный ответ.

Аналогичный поиск вакцин-ассоциированных клонов был выполнен и в репертуарах  $\beta$ -цепей TCR субпопуляции CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток, включающей различные подмножества Т-клеток памяти. В общей сложности 58–79% ответивших клонов хотя бы один раз были обнаружены в репертуаре Т-клеток памяти и их количество увеличивалось после каждой иммунизации (Рисунок 6Б). При этом около половины ( $46 \pm 17,7\%$ ) вакцин-ассоциированных клонов, впервые обнаруженных в субпопуляции Т-клеток памяти после второй вакцинации, отсутствовали и в репертуарах PVMCs, собранных в дни -14, 0 и 30. Это позволяет предположить, что повторная иммунизация через 30 дней не только ре-стимулирует уже существующие Т-клетки памяти, но и приводит к рекрутингу новых клонов. Ещё одним важным наблюдением, объясняющим высокую эффективность вакцины против КЭ, является то, что до 70% вакцин-ассоциированных клонов оставались на детектируемом уровне в репертуаре Т-клеток памяти через 1,5 месяца после завершения курса вакцинации (день 75) и, вероятно, в дальнейшем могут обеспечить долгосрочную защиту от КЭ.



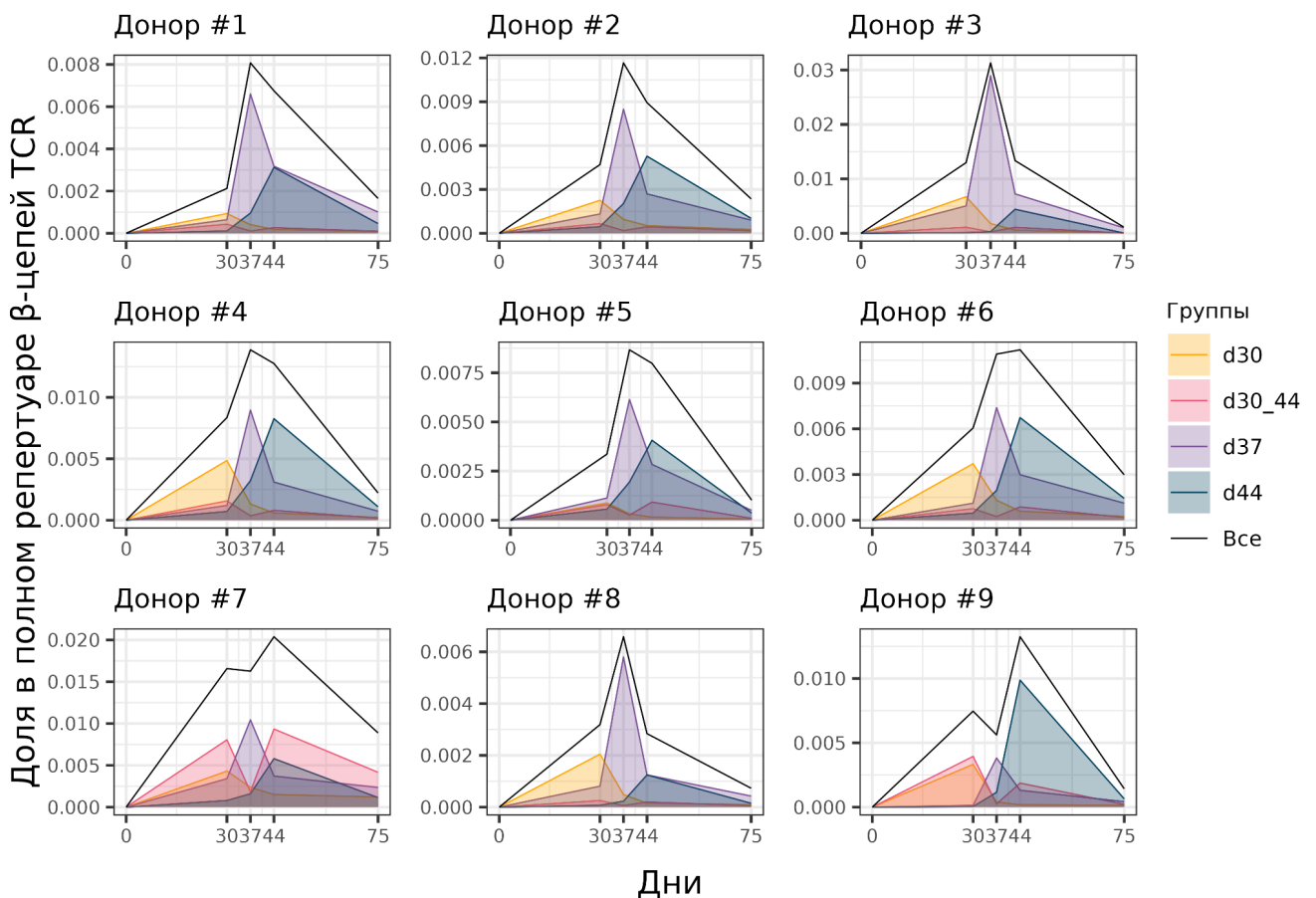
**Рисунок 6.** Фенотипические характеристики Т-клеточного ответа на вакцину против КЭ. **А.** Доля CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеточных клонов от суммарной представленности всех вакцин-ассоциированных клонов на пике экспансии. Ширина столбика отражает соотношение количеств CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеточных клонов. **Б.** Кумулятивная доля вакцин-ассоциированных клонов, найденных в репертуарах  $\beta$ -цепей TCR субпопуляции Т-клеток памяти (CD45RO<sup>+</sup>) на день 0 (0), к 30-му дню (30), к 75-му дню (75), от всех вакцин-ассоциированных клонов того же донора.

Для подтверждения специфичности вакцин-ассоциированных клонов к эпитопам вируса КЭ мы проанализировали репертуар  $\beta$ -цепей TCR Т-клеток, экспрессирующих CD137 или продуцирующих IFN $\gamma$  в ответ на *in vitro* стимуляцию инактивированными очищенными частицами вируса КЭ, для двух доноров (#5 и #6). Для обоих доноров около 10% вакцин-ассоциированных клонов были обнаружены в репертуарах *in vitro* активированных

Т-клеток, что косвенно подтверждает их участие в иммунном ответе на вакцинацию против КЭ *in vivo*. Также большая часть (77,8% и 85,5% для доноров #5 и #6, соответственно) “активированных” вакцин-ассоциированных клонов в дальнейшем была обнаружена в репертуарах Т-клеток памяти.

### 3.3. Изучение динамики отдельных групп вакцин-ассоциированных клонов

Более детальное изучение Т-клеточного ответа показало, что общая динамика вакцин-ассоциированных клонов состоит из нескольких волн клональной экспансии различной величины. Мы разделили все вакцин-ассоциированные клоны на четыре группы: d30, d30\_44, d37 и d44, в соответствии с днём, для которого была зафиксирована наибольшая представленность клона (Рисунок 7).

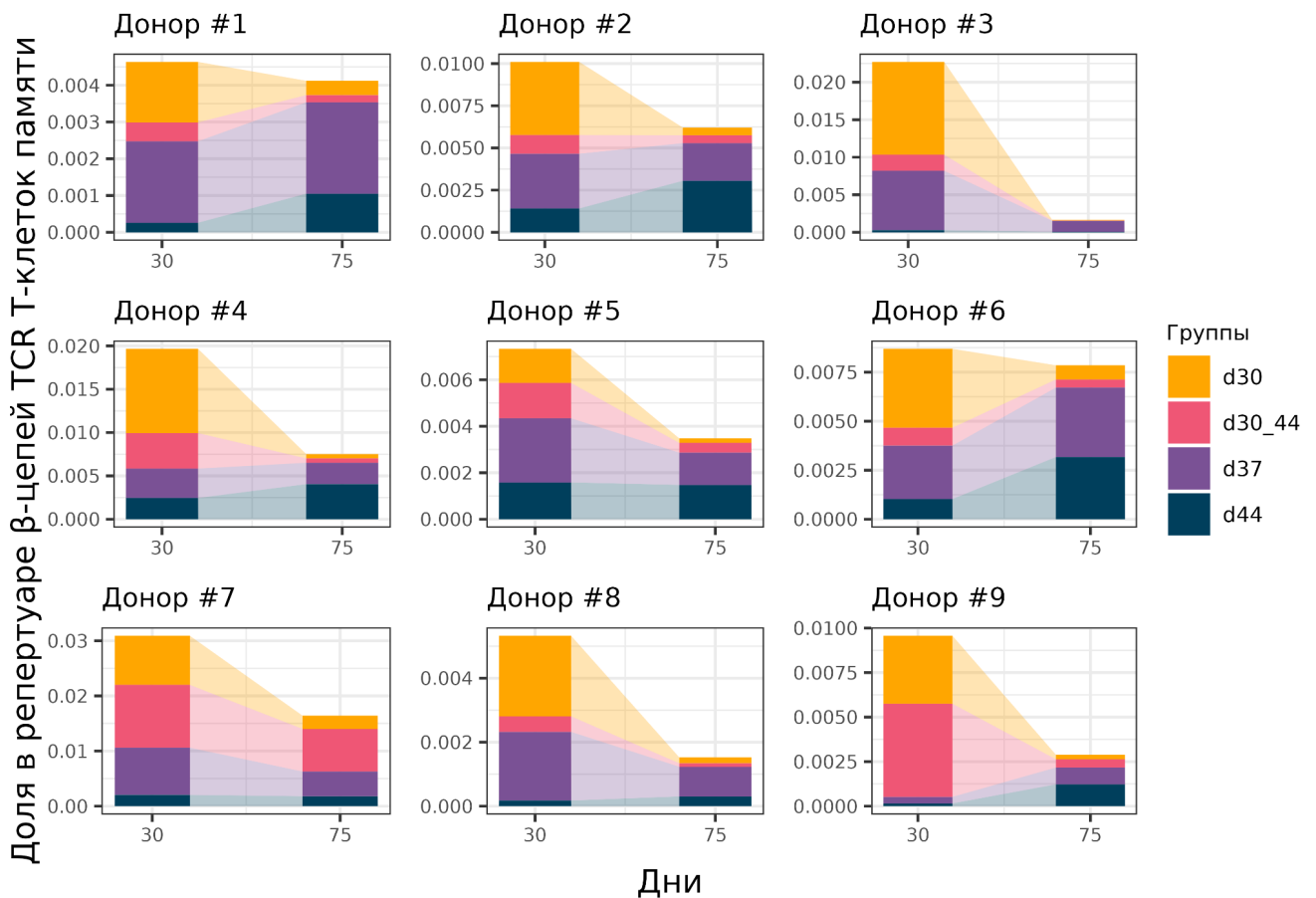


**Рисунок 7.** Динамика групп вакцин-ассоциированных клонов. В группу “d30” (желтый) входят клоны с наибольшей представленностью на день 30, в группу “d37” (фиолетовый) – на день 37, в группу “d44” (синий) – на день 44, клоны из группы “d30\_44” (розовый) имеют два пика: на дни 30 и 44. Чёрной линией обозначена совокупная динамика всех клонов. Доноры #10 и #11 были исключены из анализа из-за неполного набора образцов.

Наиболее многочисленными оказались группы “d37” и “d44” с пиком экспансии на 37-й и 44-й дни, соответственно. Около  $40,7 \pm 12\%$  клонов из группы “d37” и  $26,6 \pm 15,3\%$  клонов из

группы “d44” также были обнаружены в репертуаре Т-клеток памяти перед второй иммунизацией (день 30), что делает клоны из этих групп наиболее вероятными кандидатами на роль ре-активированных Т-клеточных клонов в ответ на повторное введение вакцины. При этом суммарно клоны из группы “d37” имели более высокую представленность в репертуаре Т-клеток памяти на день 30, чем клоны из группы “d44” (Рисунок 8,  $p = 0,003906$  для двухстороннего критерия знаковых рангов Уилкоксона), что могло стать одной из причин более высокой скорости пролиферации в ответ на вторую вакцинацию. Помимо этого, на скорость пролиферации могли влиять и другие факторы, такие как клеточная численность клона на момент стимуляции, аффинность TCR, цитокиновый фон и функциональное состояние стимулированных Т-клеток. В то же время часть клонов из групп “d37” и “d44” могли быть впервые рекрутированы только после второй вакцинации.

Но вместе с тем, мы не обнаружили статистически значимых различий в соотношении  $CD4^+/CD8^+$  Т-клеточных клонов между группами “d37” и “d44” для всех доноров, кроме донора #8, у которого доля  $CD4^+$  Т-клеточных клонов была значительно ниже в группе “d44” (G-тест,  $p = 0,0017$ ).



**Рисунок 8.** Представленность групп вакцин-ассоциированных клонов в репертуарах  $\beta$ -цепей TCR субпопуляции Т-клеток памяти ( $CD45RO^+$ ), полученных в дни 30 и 75.

Отдельное внимание привлекла группа “d30\_44”, которая демонстрировала “двухпиковую” (дни 30 и 44) динамику, с сокращением представленности ко дню 37 и последующей повторной экспансией ко дню 44. У большинства доноров эта группа была минорной, однако, для доноров #7 и #9 её вклад в общий ответ оказался значительным, что привело к формированию “двухпикового” Т-клеточного ответа с наибольшей экспансией на день 44 (Рисунок 7, чёрная линия). Здесь важно отметить, что представленность клона, измеренная на день 30, соответствует фазе снижения клональной численности после ответа на первую вакцинацию, тогда как представленность на день 44 соответствует клональной экспансии после второй вакцинации. Причины, по которым мы наблюдали экспансию клонов этой группы только через 2 недели после введения второй вакцины, могут быть аналогичными причинам “отложенной” экспансии для клонов из группы “d44”. Но вместе с тем, мы не наблюдали значительного увеличения клональной представленности на день 44, и пики на дни 30 и 44 оказались сопоставимыми для большинства клонов, что может указывать на низкий пролиферативный потенциал Т-клеток этой группы клонов.

В отличие от описанных выше групп, представленность клонов из группы “d30” была наибольшей на день 30, а затем постепенно снижалась, несмотря на повторную иммунизацию. Но при этом около 70% клонов из этой группы было обнаружено в репертуаре Т-клеток памяти на день 30. Можно предположить, что одной из причин слабого ответа на рестимуляцию был истощённый фенотип Т-клеток данных клонов. В частности, ранее было показано, что предшественники подобных истощённым Т-клеток памяти имеют более низкую скорость пролиферации и производят потомство с пониженной функциональной активностью, чем предшественники классических Т-клеток памяти. Т-клетки с истощённым фенотипом были замечены при различных видах инфекции и их образование в том числе может быть вызвано стимуляцией высокой дозой антигена, что обычно свойственно инактивированным вакцинам.

#### 3.4. Сравнение аминокислотных последовательностей $\beta$ -цепи TCR вакцин-ассоциированных клонов

Ранее было показано, что один антиген может вызвать активацию и стимулировать пролиферацию нескольких клонов с идентичной или похожей антигенной специфичностью, которая определяется аминокислотной последовательностью TCR, поэтому мы также ожидали обнаружить экспансию клонов с похожими последовательностями  $\beta$ -цепи TCR. Для того, чтобы это проверить, мы решили оценить сходство  $\beta$ -цепей TCR вакцин-ассоциированных клонов, попарно сравнив аминокислотные последовательности антиген-распознающего участка CDR3 клонов с идентичными V- и J-сегментами и одинаковой длиной CDR3. В результате сравнения было обнаружено до 142 клонов (медиана 27, Q1 = 23,5 – Q3 = 38), содержащих не более одной

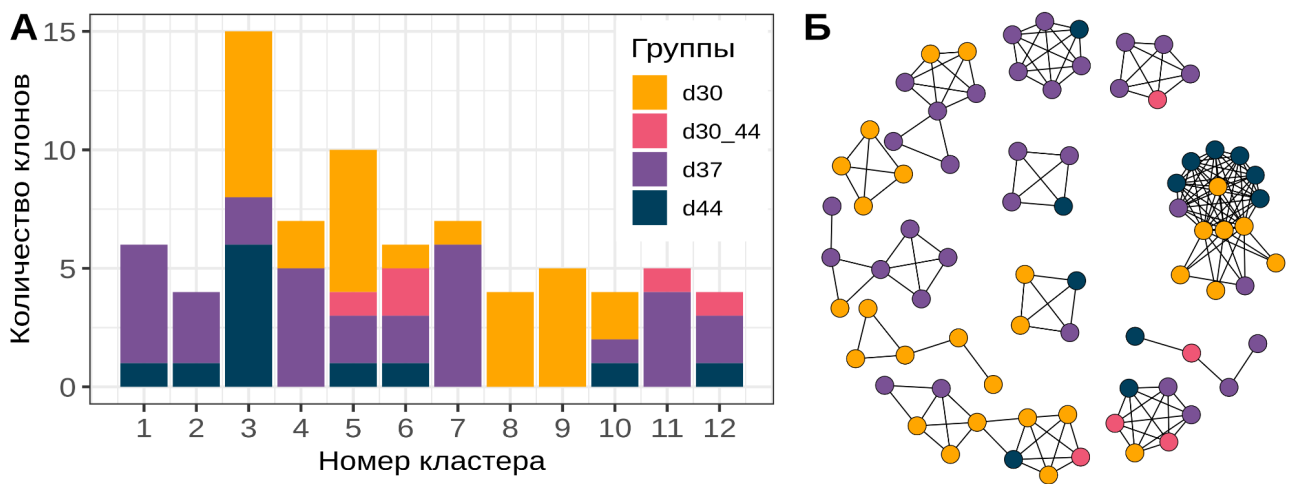




вакцин-ассоциированных клонов ( $p < 0,001$  после коррекции методом Бенджамини-Хохберга), которые также отсутствовали в репертуарах РВМСs, полученных до вакцинации.

Все ответившие клоны затем были сгруппированы в кластеры клонов с похожими CDR3 (не более одной аминокислотной замены), но с идентичными V- и J-сегментами и одинаковой длиной CDR3. В результате для каждого донора было сформировано около 35 кластеров (медиана,  $Q1 = 28,5 - Q3 = 39,5$ ), многие из которых содержали как сильно экспандированные клоны (обнаруженные с помощью edgeR), так и клоны со слабо изменившейся представленностью (обнаруженные с помощью ALICE). Большое количество сформированных кластеров может указывать на специфичность вакцин-ассоциированных клонов к широкому спектру эпитопов вируса КЭ и, следовательно, формирование устойчивой к вирусным мутациям Т-клеточной защиты.

Затем мы проанализировали динамику изменения представленности клонов из одного кластера (для кластеров из четырёх и более клонов), и обнаружили, что только 22% (медиана,  $Q1 = 13 - Q3 = 35$ ) кластеров содержали клоны с одинаковой динамикой (Рисунок 10). Это может свидетельствовать о том, что несмотря на высокую степень сходства аминокислотных последовательностей  $\beta$ -цепей TCR, Т-клетки этих клонов могли выполнять различные функции в ходе иммунного ответа. Также разная динамика может быть связана с различиями в аффинности TCR, приводя к более выраженной и быстрой экспансии более высокоаффинных клонов.



**Рисунок 10.** Динамика изменения представленности ответивших клонов из одного кластера, содержащего четыре и более вакцин-ассоциированных клонов с похожими аминокислотными последовательностями  $\beta$ -цепей TCR (идентичные V- и J-сегменты и одинаковая длина CDR3, не более одной аминокислотной замены в CDR3). **А.** Распределение клонов, относящихся к разным группам по типу динамики, в каждом кластере. **Б.** Кластеры вакцин-ассоциированных клонов, представленные в виде графа. Каждая вершина соответствует отдельному клону, клоны с похожими  $\beta$ -цепями TCR соединены линиями. Цветовое обозначение соответствует обозначению групп на столбчатой диаграмме слева (А). Показан пример для донора #1.

### 3.5. Сходство аминокислотных последовательностей $\beta$ -цепей TCR вакцин-ассоциированных клонов разных доноров

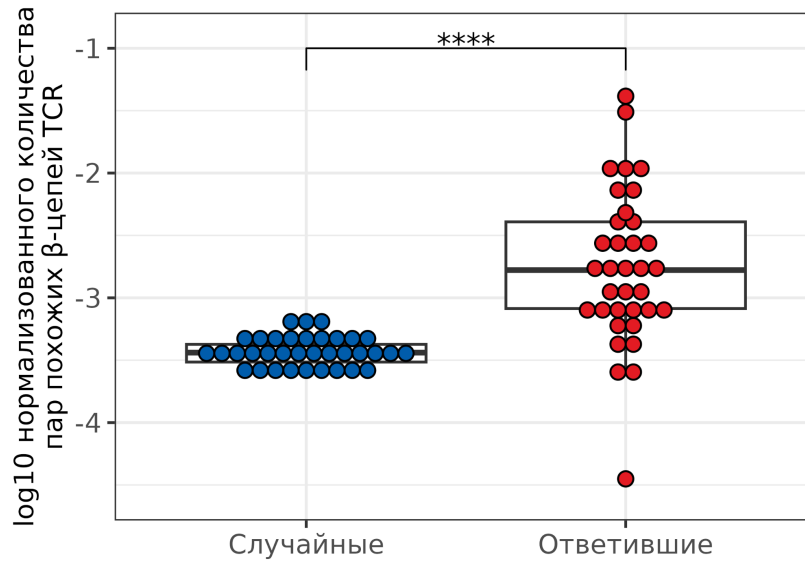
Так как доноры с общими аллелями HLA получили идентичную вакцину, то можно предположить, что у них были сформированы идентичные или очень похожие комплексы рМНС, которые затем были распознаны Т-клеточными клонами с похожей специфичностью. Однако, прежде чем оценивать сходство вакцин-ассоциированных клонов разных доноров, мы исключили клоны с уже известной специфичностью ко многим широко распространённым патогенам. Для этого мы выполнили поиск всех вакцин-ассоциированных в курируемой базе данных VDJdb. Все клоны, соответствующие записям в базе с совпадающими аллелями HLA, V- и J-сегментами, идентичной длиной CDR3 и имеющие не более одной аминокислотной замены в CDR3, были исключены из последующего анализа.

Для отфильтрованных клонов мы оценили сходство аминокислотных последовательностей  $\beta$ -цепей TCR, попарно сравнив вакцин-ассоциированные клоны от разных доноров. Но так как пары похожих клонов могли возникнуть просто в результате высокой степени сходства репертуаров  $\beta$ -цепей TCR отдельных доноров, мы выполнили ту же процедуру для случайно отобранных клонов соответствующих доноров. Сравнение полученных выборок показало статистически значимое преобладание пар похожих клонов (идентичные V- и J-сегменты и одинаковая длина CDR3, не более одной аминокислотной замены в CDR3) среди вакцин-ассоциированных клонов (Рисунок 11).

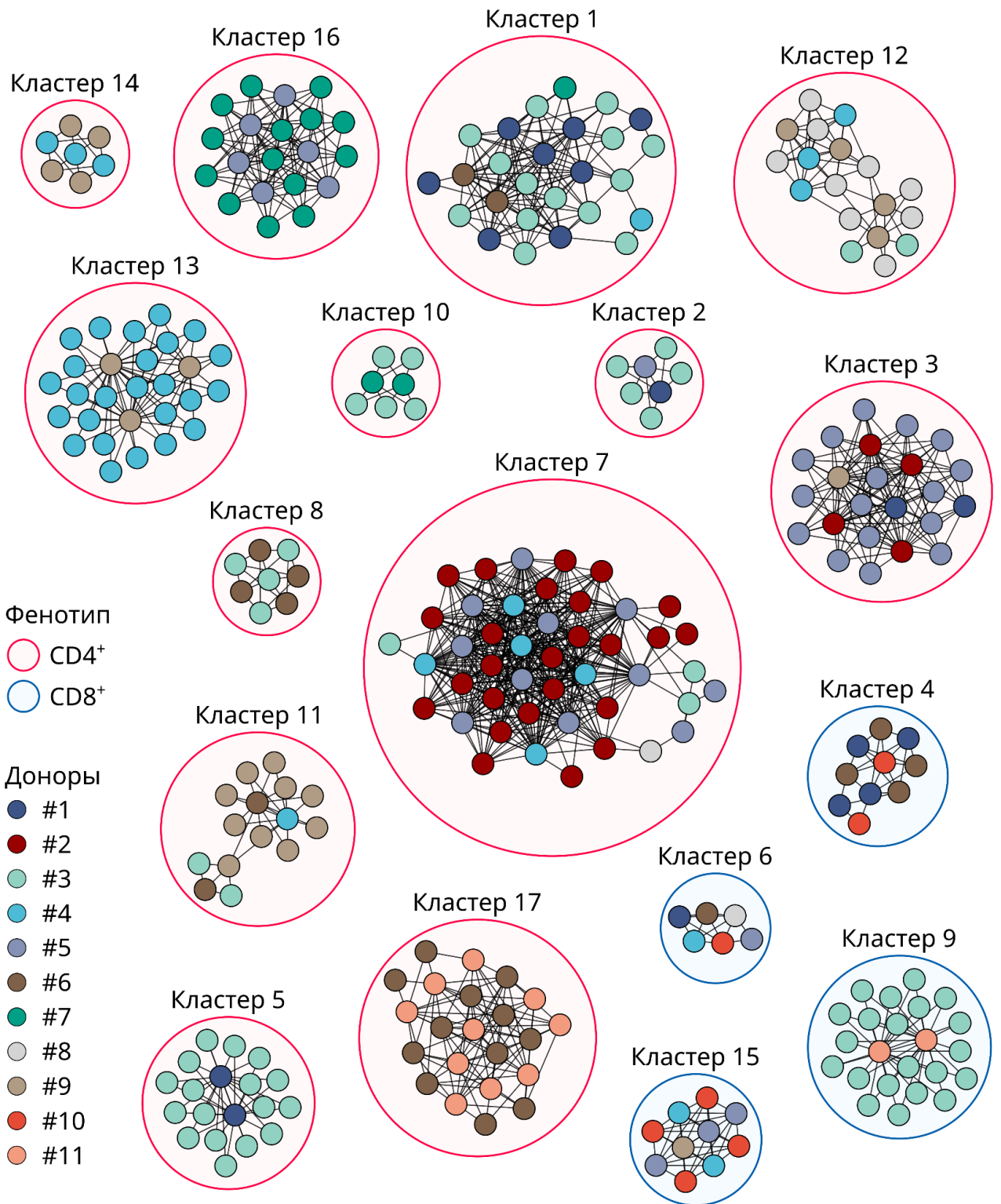
Затем мы объединили похожие клоны от всех доноров и получили 17 кластеров, состоящих из шести и более клонов, при условии, что каждый клон был похож хотя бы на два клона от других доноров (Рисунок 12). Больше половины кластеров (9 из 17) состояли из вакцин-ассоциированных клонов трёх и более доноров. Клоны четырёх кластеров (4, 6, 9 и 15) также были обнаружены в репертуарах субпопуляции CD8<sup>+</sup> Т-клеток соответствующих доноров, а клоны из остальных кластеров – в репертуарах субпопуляции CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Ещё три и два клона из кластеров 8 и 17, соответственно, были обнаружены в репертуаре CD137<sup>+</sup> Т-клеток донора #6, полученных в день 44. Для каждого кластера мы определили мотив аминокислотной последовательности CDR3 (Рисунок 13).

Вероятно, преобладание CD4<sup>+</sup> кластеров является следствием преимущественной активации CD4<sup>+</sup> Т-клеток в ответ на инактивированную вакцину против КЭ, а следовательно, и бóльшим разнообразием CD4<sup>+</sup> Т-клеточных клонов, что обеспечивает более высокую вероятность совпадения аминокислотных последовательностей  $\beta$ -цепей TCR у разных доноров. Мотивы, полученные для кластеров вакцин-ассоциированных клонов могут быть полезными для поиска иммунодоминантных эпитопов структурных белков вируса КЭ, которые презентуются в составе HLA классов I и II. Полученные комбинации  $\beta$ -цепей TCR и аллелей

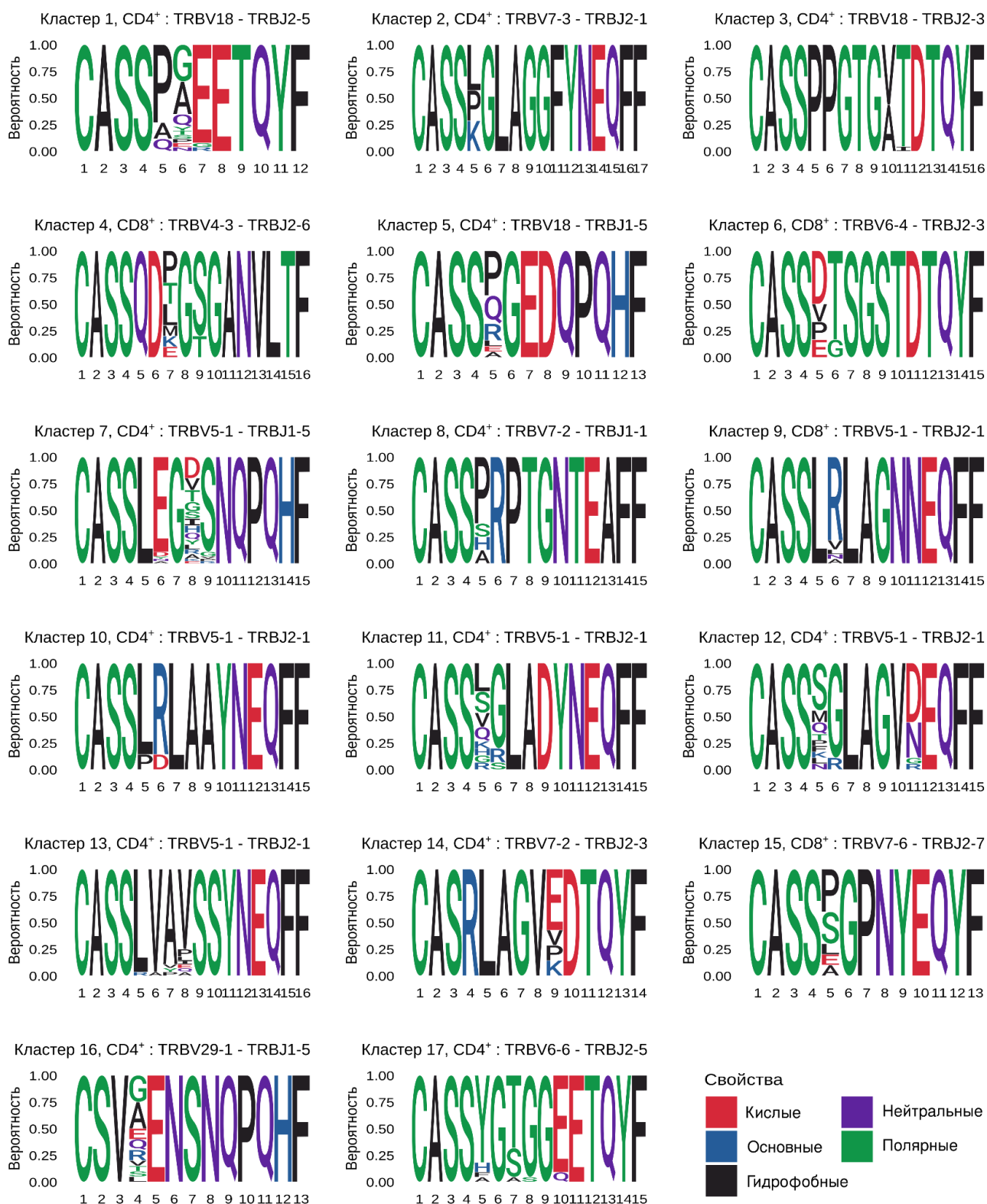
HLA в дальнейшем можно использовать для построения 3D-моделей и поиска кандидатных комплексов pMHC для создания соответствующих мультимеров.



**Рисунок 11.** Сравнение количества пар клонов с похожими аминокислотными последовательностями β-цепей TCR (идентичные V- и J-сегменты и одинаковая длина CDR3, не более одной аминокислотной замены в CDR3) среди ответивших и случайно отобранных клонов разных доноров, нормированных на количество возможных пар в каждом подмножестве клонов. Случайные клоны были отобраны из репертуаров РВМСs, полученных в дни 30, 37 и 44, для каждой пары выборок от разных доноров было подсчитано нормированное количество пар клонов. Для каждой пары репертуаров РВМСs отбор случайных клонов и подсчёт пар похожих клонов был выполнен 100 раз, для сравнения с ответившими клонами было подсчитано среднее значение. Для оценки значимости был использован двухсторонний парный критерий знаковых рангов Уилкоксона, \*\*\*\* –  $p = 3,2 \times 10^9$ .



**Рисунок 12.** Кластеры вакцин-ассоциированных клонов разных доноров с похожими аминокислотными последовательностями  $\beta$ -цепей TCR (идентичные V- и J-сегменты и одинаковая длина CDR3, не более одной аминокислотной замены в CDR3), представленные в виде графа. Каждая вершина соответствует отдельному клону, клоны с похожими  $\beta$ -цепями TCR и от разных доноров соединены линиями. Цвет области вокруг кластеров обозначает фенотип T-клеточных клонов в кластере: CD4<sup>+</sup> (красный) или CD8<sup>+</sup> (синий).



**Рисунок 13.** Аминокислотные мотивы CDR3  $\beta$ -цепей TCR кластеризованных вакцин-ассоциированных клонов от разных доноров. Нумерация кластеров соответствует нумерации на Рисунке 30, также указан фенотип (CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup>) Т-клеточных клонов и комбинация VJ-сегментов. Аминокислотные остатки окрашены в соответствии с их химическими свойствами.

## Заключение

В этой работе мы впервые описали Т-клеточный ответ на вакцины против гриппа и КЭ на уровне отдельных клонов. Производство обеих вакцин основано на инактивированном вирусе, но в дальнейшем они имеют существенные различия по типу антигена, постоянству антигенного состава, протоколу иммунизации и т.д., что может приводить к разному ответу иммунной системы на каждую из вакцин. Кроме того, дополнительное влияние оказывает предыдущий опыт встречи с антигенами вируса.

Широко используемые противогриппозные субъединичные вакцины содержат только поверхностные антигены вируса гриппа разных штаммов, набор которых ежегодно меняют из-за высокой вариабельности вируса. По этой причине для регулярного обновления иммунной защиты требуется ежегодная ревакцинация, и кроме того, сам вирус гриппа постоянно присутствует в популяции. Вероятно, по этой причине нами не было обнаружено ярко выраженных изменений в репертуаре  $\beta$ -цепей TCR РВМС в ответ на вакцинацию против гриппа, а представленность “новых” клонов Т-клеток памяти не повышалась при последующих ревакцинациях.

Совсем иначе выглядел иммунный ответ на цельновирионную вакцину против КЭ, которая предполагает последовательное введение двух доз с интервалом в один месяц. Практически все доноры встретились с антигенами вируса КЭ впервые и поэтому продемонстрировали сильный Т-клеточный ответ. Более того, детальный клональный трекинг позволил выявить несколько волн клональной экспансии, у каждой из которых может быть своя роль в иммунном ответе. Также мы впервые показали, что вакцина против КЭ индуцирует  $CD8^+$  Т-клеточный ответ, что раньше не удавалось обнаружить методами *in vitro*.

Тем не менее, несмотря на разную силу и динамику Т-клеточного ответа на вакцины, в обоих случаях удалось обнаружить новые клоны Т-клеток памяти после вакцинации. Для вакцины против КЭ обогащение репертуара Т-клеток памяти происходило после каждой иммунизации, а для противогриппозной вакцины обнаруженные клоны оставались на детектируемом уровне в течение двух последующих сезонов. Это важное наблюдение, поскольку целью любой вакцинации является формирование иммунологической памяти, которая в дальнейшем сможет обеспечить долгосрочную защиту от инфекции.

Другой не менее важный аспект иммунологической защиты – многообразие антигенов, которое могут узнавать Т-клетки. Для вакцины против КЭ мы показали, что у каждого донора образуется множество кластеров вакцин-ассоциированных клонов с похожей специфичностью TCR, что указывает на множество эпитопов, к которым был сформирован иммунный ответ. Также мы обнаружили общие мотивы для разных доноров, которые могут указывать на клоны, специфичные к иммунодоминантным эпитопам вируса КЭ. Поиск таких эпитопов является



перспективным направлением в дальнейших исследованиях, поскольку создание мультимеров с антигенами вируса КЭ позволит детальнее изучить вирус-специфичный Т-клеточный иммунный ответ.

### **Выводы**

1. С помощью технологии 5'-RACE+SMART и высокопроизводительного секвенирования впервые было изучено продолжительное влияние вакцин против гриппа и клещевого энцефалита на динамику и клональное разнообразие Т-клеточного ответа.
2. По результатам анализа репертуаров  $\beta$ -цепей TCR была обнаружена экспансия как  $CD4^+$ , так и  $CD8^+$  Т-клеточных клонов в ответ на каждую из вакцин, и в обоих случаях по количеству клонов и силе экспансии преобладал  $CD4^+$  Т-клеточный ответ.
3. Сезонная вакцинация против гриппа привела к переходу новых клонов в субпопуляцию Т-клеток памяти и сохранению таких клонов в репертуарах  $\beta$ -цепей TCR в течение как минимум двух лет.
4. В ответ на вакцину против клещевого энцефалита у разных доноров была обнаружена экспансия от 302 до 1706 вакцин-ассоциированных клонов, которые суммарно занимали до 3% репертуара  $\beta$ -цепей TCR на пике экспансии.
5. Впервые было показано, что вакцина против клещевого энцефалита способна индуцировать  $CD8^+$  Т-клеточный ответ.
6. Т-клеточный ответ на вакцину против клещевого энцефалита состоял из нескольких волн клональной экспансии, которые отличались по времени и силе экспансии, а также по скорости перехода и продолжительности сохранения в субпопуляции Т-клеток памяти.
7. В результате сравнительного анализа антиген-распознающих участков  $\beta$ -цепей TCR было выявлено несколько десятков кластеров для каждого донора, что может свидетельствовать о широком спектре антигенной специфичности вакцин-ассоциированных клонов.
8. Общие мотивы антиген-распознающего участка  $\beta$ -цепей TCR вакцин-ассоциированных клонов разных доноров, получивших вакцину против клещевого энцефалита, указывают на наличие иммунодоминантных эпитопов в составе вакцины.

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

#### **Статьи в рецензируемых журналах:**

1. **Sycheva A.L.**, Komech E.A., Pogorelyy M.V., Minervina A.A., Urazbakhtin S.Z., Salnikova M.A., Vorovitch M.F., Kopantzev E.P., Zvyagin I.V., Komkov A.Y., Mamedov I.Z., Lebedev Y.B. Inactivated tick-borne encephalitis vaccine elicits several overlapping waves of T cell response // *Front. Immunol.* 2022. T. 13. С. 970285.



2. **Sycheva A.L.**, Pogorelyy M.V., Komech E.A., Minervina A.A., Zvyagin I.V., Staroverov D.B., Chudakov D.M., Lebedev Y.B., Mamedov I.Z. Quantitative profiling reveals minor changes of T cell receptor repertoire in response to subunit inactivated influenza vaccine // *Vaccine*. 2018. T. 36, № 12. С. 1599–1605.
3. Pogorelyy M.V., Minervina A.A., Touzel M.P., **Sycheva A.L.**, Komech E.A., Kovalenko E.I., Karganova G.G., Egorov E.S., Komkov A.Y., Chudakov D.M., Mamedov I.Z., Mora T., Walczak A.M., Lebedev Y.B. Precise tracking of vaccine-responding T cell clones reveals convergent and personalized response in identical twins // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2018. T. 115, № 50. С. 12704–12709.
4. Shugay M., Bagaev D.V., Zvyagin I.V., Vroomans R.M., Crawford J.C., Dolton G., Komech E.A., **Sycheva A.L.**, Koneva A.E., Egorov E.S., Eliseev A.V., Van Dyk E., Dash P., Attaf M., Rius C., Ladell K., McLaren J.E., Matthews K.K., Clemens E.B., Douek D.C., Luciani F., Van Baarle D., Kedzierska K., Kesmir C., Thomas P.G., Price D.A., Sewell A.K., Chudakov D.M. VDJdb: a curated database of T-cell receptor sequences with known antigen specificity // *Nucleic Acids Res.* 2018. T. 46, № D1. С. D419–D427.
5. Pogorelyy M.V., Elhanati Y., Marcou Q., **Sycheva A.L.**, Komech E.A., Nazarov V.I., Britanova O.V., Chudakov D.M., Mamedov I.Z., Lebedev Y.B., Mora T., Walczak A.M. Persisting fetal clonotypes influence the structure and overlap of adult human T cell receptor repertoires // *PLoS Comput. Biol.* 2017. T. 13, № 7. С. e1005572.
6. Zvyagin I.V., Mamedov I.Z., Tatarinova O.V., Komech E.A., Kurnikova E.E., Boyakova E.V., Brilliantova V., Shelikhova L.N., Balashov D.N., Shugay M., **Sycheva A.L.**, Kasatskaya S.A., Lebedev Y.B., Maschan A.A., Maschan M.A., Chudakov D.M. Tracking T-cell immune reconstitution after TCR $\alpha\beta$ /CD19-depleted hematopoietic cells transplantation in children // *Leukemia*. 2017. T. 31, № 5. С. 1145–1153.

#### **Тезисы докладов на конференциях:**

1. **Sycheva A.L.**, Pogorelyy M.V., Komech E.A., Urazbakhtin S.Z., Minervina A.A., Kopancev E.P., Vorovitch M.F., Zvyagin I.V., Mamedov I.Z., Lebedev Y.B. Features of T-cell immune response to tick-borne encephalitis vaccine // 6th European Congress of Immunology, Virtual meeting, September 1-4, 2021, *European Journal of Immunology* T. 51(S1), С. 284.
2. **Сычева А.Л.**, Погорелый М.В., Комеч Е.А., Завягин И.В., Мамедов И.З., Лебедев Ю.Б. Изучение вирус-ассоциированных субпопуляций Т-лимфоцитов, формирующих иммунный ответ на вакцину против клещевого энцефалита // XXXI зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 11-14 февраля, 2019. Сборник тезисов с. 30.

3. **Sycheva A.L.**, Pogorelyy M.V., Komech E.A., Zvyagin I.V., Mamedov I.Z., Lebedev Y.B. Virus-associated subpopulations of T-lymphocytes forming antiviral immune response to tick-borne encephalitis vaccine // 5th European Congress of Immunology, September 2-5, 2018, Amsterdam, The Netherlands. Abstract book p. 168.
4. **Сычева А.Л.**, Погорелый М.В., Комеч Е.А., Звягин И.В., Мамедов И.З., Лебедев Ю.Б. Изучение малых субпопуляций активированных Т-лимфоцитов из крови доноров, вакцинированных против вируса жёлтой лихорадки // XXIX зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 7-10 февраля, 2017. Сборник тезисов с. 98.
5. **Sycheva A.L.**, Pogorelyy M.V., Komech E.A., Mamedov I.Z., Lebedev Y.B. Dynamics of human T cell repertoire in course of influenza vaccination and subsequent revaccination within a year // 12th EFIS-EJI Tatra Immunology Conference “Molecular determinants of T-cell immunity”, Strbske Pleso, Slovakia, September 3-7, 2016. Abstract book p. 68.
6. **Сычева А.Л.**, Погорелый М.В., Комеч Е.А., Мамедов И.З., Лебедев Ю.Б. Динамика Т-клеточного репертуара человека в ходе противогриппозной вакцинации и ревакцинации // XXVIII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 8-11 февраля, 2016. Сборник тезисов с. 27.
7. **Sycheva A.L.**, Pogorelyy M.V., Komech E.A., Mamedov I.Z., Lebedev Y.B. Dynamics of human T cell repertoire in course of influenza vaccination and subsequent revaccination within a year // 4th European Congress of Immunology, Vienna, Austria, September 6-9, 2015. Abstract book p 433.